

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Jolana Kučerová

Význam S1 podmísta intramembránových proteas z rodiny rhomboidů pro katalýzu  
a návrh inhibitorů

*Significance of the S1 subsite of rhomboid intramembrane proteases for catalysis  
and inhibitor design*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Kvido Stříšovský, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Ing. Kvida Stříšovského, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne: .....

.....

Jolana Kučerová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Kvidovi Stříšovskému, Ph.D. za zajímavé téma mé bakalářské práce, za jeho čas a podporu při jejím psaní. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného prostředí, zejména Mgr. Editě Poláchové za pomoc v začátcích mé práce v této laboratoři. Zvláštní dík patří především Mgr. Anežce Tiché za její trpělivost, všestrannou pomoc a čas, které mi věnovala po celou dobu mé experimentální činnosti. Děkuji také Stanchu Stanchevovi, Ph.D. a RNDr. Pavlu Majerovi, CSc, za syntézu testovaných substrátů a inhibitorů a Ing. Radko Součkovi za kvantitativní aminokyselinovou analýzu.

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vývojem specifických inhibitorů intramembránových proteas z rodiny rhomboidů. Tyto inhibitory jsou potřebné pro buněčně biologické studium rhomboidových proteas i jejich potenciální farmakologické zacílení. Intramembránové proteasy z rodiny rhomboidů jsou spojovány s různými onemocněními, jako například malárií, Parkinsonovou chorobou, rakovinou, či toxoplazmózou. Laboratoř školitele nedávno objevila první skupinu takovýchto inhibitorů, peptidyl ketoamidy. Pro jejich plné využití je nutné vlastnosti a možnosti modifikace těchto látek blíže prozkoumat. Cílem této práce bylo prostřednictvím syntetických fluorogenních substrátů a enzymové kinetiky ověřit možnosti využití S1 podmísta v aktivním místě rhomboidu pro návrh inhibitorů se zvýšenou účinností a selektivitou, a také pomocí variant substrátů se záměnami v P1 pozici za nepřírozené aminokyseliny prozkoumat mechanismus transferu vody do aktivního místa rhomboidové proteasy. Ze srovnání rychlosti štěpení deseti fluorogenních substrátů s modifikací v P1 pozici rhomboidem GlpG z *E. coli* bylo zjištěno, že nejlépe přijímané postranní řetězce aminokyselin v P1 pozici (vážící se do S1 podmísta) jsou pro GlpG  $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$  a  $-\text{CH}_3$ . Tento trend se potvrdil i u peptidyl ketoamidových inhibitorů. Ze studia substrátů a inhibitorů vyplývá, že velký potenciál pro další výzkum mají deriváty inhibitorů mono- či difluorované na terminální  $-\text{CH}_3$  skupině aminokyseliny v P1 pozici.

**Klíčová slova:** Intramembránová proteasa, serinová proteasa, mechanismus, inhibice, enzymová kinetika

## Abstract

This thesis focuses on the development of specific inhibitors of rhomboid intramembrane proteases. These inhibitors are needed for the cell-biological investigation of rhomboid proteases and their potential pharmacological targeting, as rhomboid proteases have been associated with various diseases, such as malaria, Parkinson's disease, cancer or toxoplasmosis. The thesis advisor's laboratory has recently discovered the first such group of compounds, the peptidyl ketoamides. To exploit them fully, it is necessary to examine their properties and the possibilities of their modifications. In this work, synthetic fluorogenic substrates and enzyme kinetics were used to examine the possibilities of exploiting the S1 subsite in the rhomboid active site for rhomboid inhibitor design. Furthermore, using variants of these substrates modified by unnatural amino acids in the P1 position, the mechanism of water transfer to the rhomboid active site was investigated. Comparison of cleavage rates of ten fluorogenic substrates modified in the P1 position revealed that the *E. coli* rhomboid protease GlpG strongly prefers side chains  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$  and  $-\text{CH}_3$  in the P1 position (i.e. binding into the S1 subsite). This trend was apparent also with peptidyl ketoamide inhibitors. The present substrate and inhibitor study suggests that derivatives of peptidyl ketoamide inhibitors mono- or difluorinated at the terminal  $-\text{CH}_3$  group of the aminoacid in the P1 position have a significant potential for further investigation.

**Keywords:** Intramembrane protease, serine protease, mechanism, inhibition, enzyme kinetics

# Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	10
1.1 Intramembránové proteasy	10
1.1.1 Objev a biologické role	11
1.1.2 Proteiny z rodiny rhomboidů	13
1.1.3 Rhomboid GlpG z <i>Escherichia coli</i> , hlavní model pro rodinu rhomboidů	15
1.1.4 Inhibitory rhomboidů	21
2 Cíle práce	25
3 Materiál a metody	26
3.1 Materiál	26
3.1.1 Použité chemikálie a ostatní materiál	26
3.1.2 Použité přístroje a pomůcky	28
3.2 Metody	29
3.2.1 Exprese proteinu	29
3.2.2 Izolace membránových proteinů	30
3.2.3 Afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech	31
3.2.4 Odsolování	32
3.2.5 Koncentrování GlpG	32
3.2.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	33

3.2.7	Stanovení aktivity rhomboidu GlpG vůči fluorogenním substrátům s mutacemi v P1 místě .....	35
3.2.8	Příprava zásobních roztoků inhibitorů .....	37
3.2.9	Příprava zásobních roztoků fluorogenních transmembránových substrátů KSp35 a KSp76 .....	37
3.2.10	Příprava alikvotů rhomboidu GlpG .....	38
3.2.11	Měření inhibice GlpG syntetickými inhibitory .....	38
3.2.12	Určování konstanty $IC_{50}$ .....	39
3.2.13	Kompetiční experiment – inhibice štěpení reportérového substrátu KSp76 kompetujícím substrátem .....	40
4	Výsledky a diskuse .....	42
4.1	Exprese a purifikace rhomboidu GlpG .....	42
4.2	Charakterizace vlivu záměn v P1 pozici substrátů na jejich účinnost štěpení rhomboidem GlpG .....	43
4.3	Vliv vybraných aminokyselin v P1 pozici peptidyl $\alpha$ -ketoamidů na jejich inhibiční vlastnosti .....	50
5	Závěr .....	54
6	Seznam použité literatury .....	55

## Seznam použitých zkratek

AMC – 7-amino-4-methylkumarin

AMP – ampicilin

APS – peroxodisíran amonný, z angl. ammonium persulphate

DABCYL – 4-(dimethylamino)azobenzen-4'sulfonylová kyselina

DCI – 3,4-dichloroisokumarin

DDM – n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid

Derlin – z angl. degradation in endoplasmic reticulum protein

DMSO – dimethylsulfoxid

EDANS – aminoethylenamin-1-naftalensulfonová kyselina

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina, z angl. ethylenediaminetetraacetic acid

EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor, z angl. epidermal growth factor receptor

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina

HFIP – hexafluoroisopropanol

HIV – virus lidské imunodeficiency, z angl. human immunodeficiency virus

HLA-E – z angl. human leukocyte antigen E

FRET – fluorescenční rezonanční přenos energie, z angl. fluorescence resonance energy transfer

IC – z angl. inhibitory concentration

IPTG – isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid

iRhomy – z angl. inactive rhomboid proteases

kDa – kilodalton

L – z angl. loop

LB – z angl. Luria-Bertani

MWCO – oddělení na základě molekulové hmotnosti, z angl. molecular weight cut-off

NK – z angl. natural killers



OD<sub>600</sub> – optická hustota při vlnové délce 600 nm, z angl. optical density  
 PARL – z angl. presenilin-associated rhomboid-like  
 PDB – z angl. protein data bank  
 PINK1 – z angl. PTEN induced kinase 1  
 PMSF – fenylmethylsulfonyl fluorid, z angl. phenylmethylsulfonyl fluoride  
 PTEN – z angl. phosphatase and tensin homolog  
 RHBDL – z angl. rhomboid-like protein  
 RPM – otáček za minutu, z angl. revolutions per minute  
 S2P – z angl. site-2-protease  
 SD – směrodatná odchylka, z angl. standard deviation  
 SDS – dodecylsírán sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate  
 SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS, z angl. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
 SOC – z angl. super optimal broth with catabolic repressor  
 SPP – z angl. signal peptide peptidase  
 SREBP – z angl. sterol regulated element binding protein  
 TAT – z angl. twin argine translocase  
 TEMED – N,N,N',N'tetramethylethyldiamin  
 TFE – tetrafluorethylen  
 TM – transmembránový  
 TMD – transmembránová doména  
 TPCK – z angl. tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone  
 TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan  
 ÚOCHB – Ústav organické chemie a biochemie  
 Å – angstrom

# 1 Úvod

## 1.1 Intramembránové proteasy

Intramembránové proteasy jsou zvláštní skupinou enzymů, které dokáží štěpit transmembránové proteiny uvnitř lipidových membrán. Vzhledem k přítomnosti těchto membrán ve všech buňkách jsou intramembránové proteasy starou, takřka všudypřítomnou skupinou vyskytující se napříč všemi říšemi [1] (Obr. 1).

Z hlediska mechanismu účinku proteas a charakteru proteolytické reakce, kdy na štěpení substrátu je třeba molekul vody, se jejich výskyt v membránách z počátku zdál poněkud paradoxní.

	Zvířata	Rostliny	Houby	Prvoci	Bakterie	Archea	Víry
S2P							
SPP							
Rhom.							

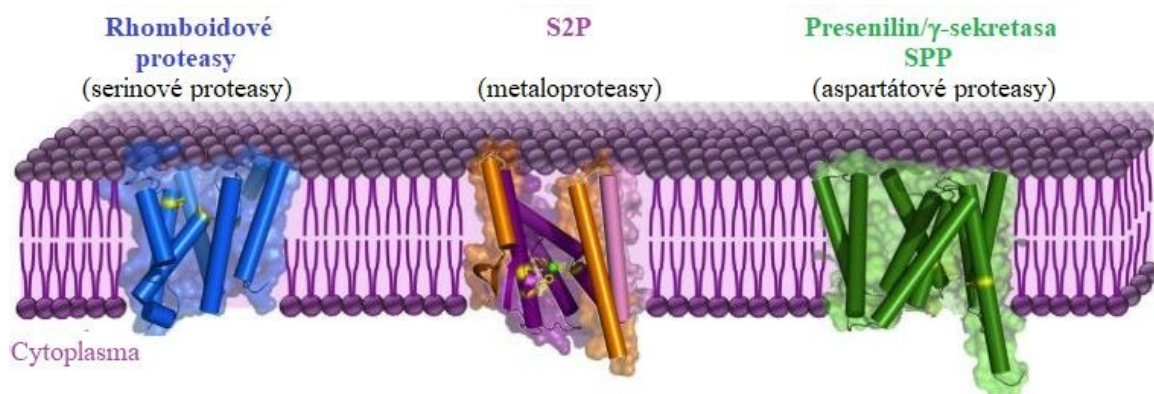
Převládající     Neobvyklé     Nepřítomné

**Obr. 1: Ilustrace zachování rodin intramembránových proteas v různých formách života. Preseniliny jsou zachovány pouze v mnohobuněčných organismech (není ukázáno). Upraveno podle [2].**

V průběhu dvaceti let byly ovšem objeveny čtyři základní skupiny intramembránových proteas lišící se v druhu chemie použité pro katalýzu. Rodina site-2-proteas (S2P) patří do skupiny metaloproteas,  $\gamma$ -sekretasa a signal peptide peptidase (SPP) do skupiny aspartátových proteas a rodina rhomboidů do skupiny serinových proteas. Nejnověji objevenou skupinou jsou glutamátové proteasy [3], o kterých se zatím ví jen málo, a proto nebudou v této práci dále podrobněji popsány. Po vyřešení 3D struktur zástupců jednotlivých rodin je zřejmé, že jejich katalytické zbytky jsou umístěny skutečně uvnitř lipidové membrány [3-7] (Obr. 2, str. 11).

Pozornost si tato skupina enzymů vyžádala kvůli zjištění spojitosti mezi dysfunkcí hlavních intramembránových proteas a onemocněními, jako například Parkinsonova

nemoc [8, 9], Alzheimerova nemoc [10], rakovina [11], diabetes 2. typu [12] a onemocněními způsobenými mikroby, jako například malárie, tuberkulóza, cholera a žloutenka typu C [2].



**Obr. 2: Modely struktur tří zástupců jednotlivých rodin intramembránových proteas.** Katalytické zbytky vystupující z transmembránových helixů umístěných v lipidové membráně jsou zobrazeny žlutě, katalytický zinek u metaloproteas zeleně. Prokaryotickými enzymy jsou rhomboid GlpG z *Escherichia coli* (PDB ID: 2NRF), site-2-proteasa MJ0392 z *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB ID: 3B4R) a presenilin JR1 z *Methanoculleus marisnigri* (PDB ID: 4HYD). Upraveno podle [13].

Výše zmíněné poznatky, jež zobrazují intramembránové proteasy jako důležité biologické regulátory a aktivní účastníky v mnoha onemocněních, tedy vybízí k bližšímu zkoumání jejich struktur, mechanismů a v neposlední řadě k rozvoji nástrojů umožňujících modulaci jejich aktivity.

## 1.1.1 Objev a biologické role

### 1.1.1.1 Site-2-proteasy (S2P)

První objevenou intramembránovou proteasou byla S2P, jakožto enzym katalyzující intramembránovou proteolýzu SREBP (z angl. sterol regulated element binding protein). Tento proces je nutný k uvolnění transkripčního faktoru, který v jádře aktivuje expresi genů potřebných pro biosyntézu cholesterolu u savců [5]. Homology S2P byly nalezeny ve všech formách života od archaeobakterií po člověka [14]. U bakterií jsou substráty S2P transkripční faktory podílející se na odpovědích na extracytoplasmatický stres [15], regulaci biosyntézy buněčné stěny [16], sporulaci [1, 17, 18] a degradaci signálních peptidů [19]. U lidí může být mutace genu pro S2P příčinou alopecie, světelné citlivosti nebo poruchy keratinizace při folikulární ichthyóze [20].

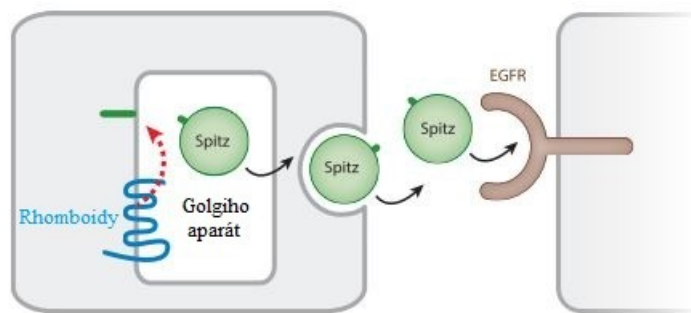
### 1.1.1.2 $\gamma$ -sekretasa a SPP

$\gamma$ -sekretasa patří do rodiny aspartátových intramembránových proteas. Byla objevena v průběhu studia Alzheimerovy nemoci, kdy byla mutace v genu kódujícím presenilin-1 (jedna ze čtyř podjednotek komplexu  $\gamma$ -sekretasy) shledána odpovědnou za vyšší produkci a sekreci hydrofobnější formy  $\beta$ -amyloidního peptidu ( $A\beta_{42}$ ), která je náchylnější k agregaci. Akumulace  $A\beta_{42}$  vně buňky způsobuje poškození důležitých mozkových struktur a následně projev této nemoci [10]. Presenilin-1 se také účastní proteolytického procesu v Notch signalizační dráze, která je zprostředkována interakcí ligandu a receptoru na sousedních buňkách (způsob nazývaný také juxtakrinní) a má důležitý vliv na proliferaci, diferenciaci a apoptosu buněk v mnohobuněčných organismech [21].

Do rodiny aspartátových proteas patří na základě podobných sekvenčních motivů charakteristických pro presenilin také SPP. Zpracování signálních peptidů pomocí SPP je nutné pro tvorbu epitopů antigenu HLA-E (z angl. human leukocyte antigen E) u lidí. Molekuly HLA-E mají speciální biologickou roli, chrání vyvíjející se plod před mateřskými NK (z angl. natural killers) buňkami. Mají tedy schopnost potlačovat matčinu imunitní odpověď na plod [7, 22]. SPP jsou také využívány virem hepatitidy C při zpracování virového polyproteinu [7].

### 1.1.1.3 Rhomboidy

První člen rodiny rhomboidů byl objeven v *Drosophila melanogaster* (octomilce), odkud také pochází jeho název podle fenotypu v tomto genu – kosočtverečný tvar skeletů hlav embryí [23]. Další práce dokázaly, že rhomboid v octomilce, který byl následně pojmenován Rhomboid 1, u ní štěpením aktivuje ligandy receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR – z angl. epidermal growth factor receptor) (Obr. 3, str. 13). EGFR se vyskytuje v plasmatické membráně napříč organismy včetně člověka. Jeho úkolem je přijímat signály z vnějšího prostředí a následně uvnitř buňky spustit odpovědi zajišťující růst a množení buněk [24].

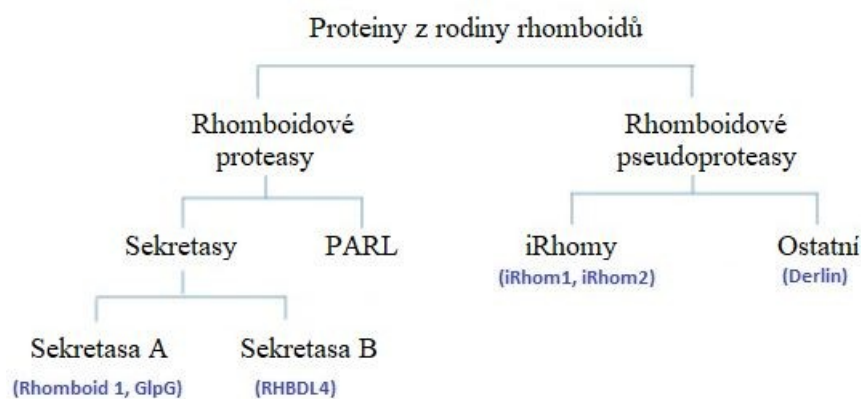


**Obr. 3: Rhomboidy 1-3 aktivující signalizaci EGFR v *Drosophila melanogaster*.** Sídli v Golgiho aparátu, kde štěpí v membráně vázanou, nezralou formu ligandu Spitz. Po uvolnění z membrány je zralý Spitz sekretován a může aktivovat EGFR v okolních buňkách. Upraveno podle [25].

Později bylo zjištěno, že Rhomboid 1 je novou intramembránovou serinovou proteasou [6] a že zástupci rodiny rhomboidů se vyskytují v téměř každém sekvenovaném genomu prokaryot i eukaryot [26, 27]. Tyto enzymy jsou tedy nejrozšířenější rodinou intramembránových proteas a také díky tomu jednou z nejlépe prostudovaných.

### 1.1.2 Proteiny z rodiny rhomboidů

Jak bylo zmíněno výše, proteiny z rodiny rhomboidů se vyskytují u všech eukaryot a převážné většiny prokaryot, kde zajišťují rozmanité biologické funkce od regulace signalizace růstového faktoru přes mitochondriální fúzi až po invazi parazitů [26, 27]. Patří do skupiny serinových proteas, ale od „klasických“ serinových proteas se odlišují využitím katalytické dyády (serin, histidin), namísto katalytické triády (serin, histidin a kyselina asparagová) [28, 29]. Tato velká rodina zahrnuje dvě velké skupiny proteinů. První skupinou jsou katalyticky aktivní rhomboidové proteasy, které se dále dělí na sekretasy (proteasy lokalizované v sekreční dráze savčích buněk) a PARL (z angl. presenilin-associated rhomboid-like). Druhou skupinou jsou nedávno objevené proteolyticky neaktivní rhomboidům podobné proteiny (pseudoproteasy), které se dále dělí na iRhomy (z angl. inactive rhomboid proteases) a skupinu dalších sekvenčně podobných, avšak obdobně proteolyticky neaktivních proteinů [27] (Obr. 4, str. 14).



**Obr. 4: Proteiny z rodiny rhomboidů zahrnující 2 velké skupiny.** První skupina – rhomboidové proteasy dělí se dále na sekretasy a PARL. Druhá skupina – proteolyticky neaktivní rhomboidové proteasy (rhomboidové pseudoproteasy), které se dále dělí na iRhomy a ostatní. Upraveno podle [30].

### 1.1.2.1 Aktivní rhomboidové proteasy

#### 1.1.2.1.1 Savčí rhomboidové proteasy

V sekreční dráze savčích buněk se nacházejí čtyři rhomboidové proteasy – RHBDL1–4. Nejlépe prostudována je RHBDL2, která byla nalezena v Golgiho aparátu a plasmatické membráně [31] a je exprimována převážně v epitelu [32]. Bylo navrženo, ale ne jasné potvrzeno, že se účastní hojení ran [31] a signalizace pomocí EGFR [32]. RHBDL4 je umístěna v endoplasmatickém retikulu a bylo navrženo, že se účastní kontroly kvality proteinů v membránách [33] a regulace EGFR ve spojení s rakovinou tlustého střeva a konečníku [34]. Zbylé dvě proteasy RHBDL1 a RHBDL3 byly nalezeny v Golgiho aparátu a plasmatické membráně [31], ale o jejich funkcích se neví příliš mnoho, protože žádné jejich substráty zatím nejsou známy.

#### 1.1.2.1.2 Mitochondriální rhomboidové proteasy

V mitochondriích eukaryot se nachází dobře popsaná proteasa PARL [27]. Při normálním stavu štěpí tato proteasa PINK1 (z angl. PTEN induced kinase 1, PTEN z angl. phosphatase and tensin homolog), což vede k potlačení mitofagie (degradace abnormální mitochondrie autofagií). Pokud je ovšem aktivita proteasy PARL snížena, k mitofagii dochází. Inhibice PARL by tedy mohla stimulovat tuto degradaci poškozených mitochondrií a být tak užitečná v léčbě Parkinsonovy nemoci, u které je jednou z příčin pravděpodobně mitochondriální dysfunkce, především nedostatečné odstraňování abnormálních mitochondrií [8, 35].

#### 1.1.2.1.3 Rostlinné, bakteriální a parazitické rhomboidové proteasy

Přestože i v rostlinách lze nalézt rhomboidové proteasy, o jejich funkcích v nich se toho ví poměrně málo [36]. Podobně je tomu u bakterií, kde nejlépe studovanou rhomboidovou proteasou je AarA v *Providencia stuartii*. AarA štěpí substrát TatA, čímž se aktivuje translokační systém TAT (z angl. twin argine translocase), který je schopen přenášet sbalené proteiny skrze lipidovou membránu [1, 37]. Významné postavení má i proteasa GlpG v *Escherichia coli*, které bude vzhledem k náplni této práce věnována samostatná kapitola.

Poměrně dobře jsou prostudovány rhomboidy protozoálních parazitů. Mnozí parazité, v nichž se rhomboidové proteasy nachází, jako například *Trichomonas vaginalis*, *Plasmodium falciparum* nebo *Toxoplasma gondii*, jsou původci vážných a rozšířených onemocnění. Extracelulární parazit *Trichomonas vaginalis*, způsobující nejčastější sexuálně přenosnou infekci, obsahuje rhomboidové proteasy TvROM1 a TvROM3. Bylo zjištěno, že zvýšená exprese TvROM3 má za následek větší adheenci a lyzi hostitelských buněk [38]. Rhomboidová proteasa TgROM1 je zase nutná pro efektivní intracelulární růst parazita *Toxoplasma gondii* [39]. Asi nejobávanější z výše zmíněných parazitů *Plasmodium falciparum*, způsobující malárii, exprimuje rhomboidové proteasy PfROM1 a PfROM4, které se na patogenitě tohoto parazita podílejí štěpením různých transmembránových proteinů potřebných pro invazi parazita [40].

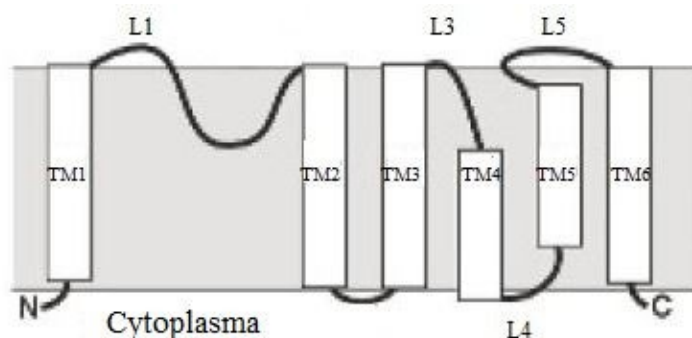
### 1.1.3 Rhomboid GlpG z *Escherichia coli*, hlavní model pro rodinu rhomboidů

Rhomboid GlpG představuje prototypickou architekturu rhomboidů, která je tvořena šesti transmembránovými helixy, z nichž čtvrtý a šestý nesou katalytickou dyádu serin a histidin. Jeho krystalografická struktura byla vůbec první strukturou intramembránové proteasy. Proto se stal modelem pro rhomboidové proteasy [41] a očekává se, že právě pochopení jeho mechanismu bude přínosné i pro ostatní členy této skupiny.

#### 1.1.3.1 Struktura

Transmembránová doména GlpG obsahuje šest hydrofobních transmembránových  $\alpha$ -helixů. Uprostřed umístěná kratší transmembránová doména 4 (TM4) je obklopena

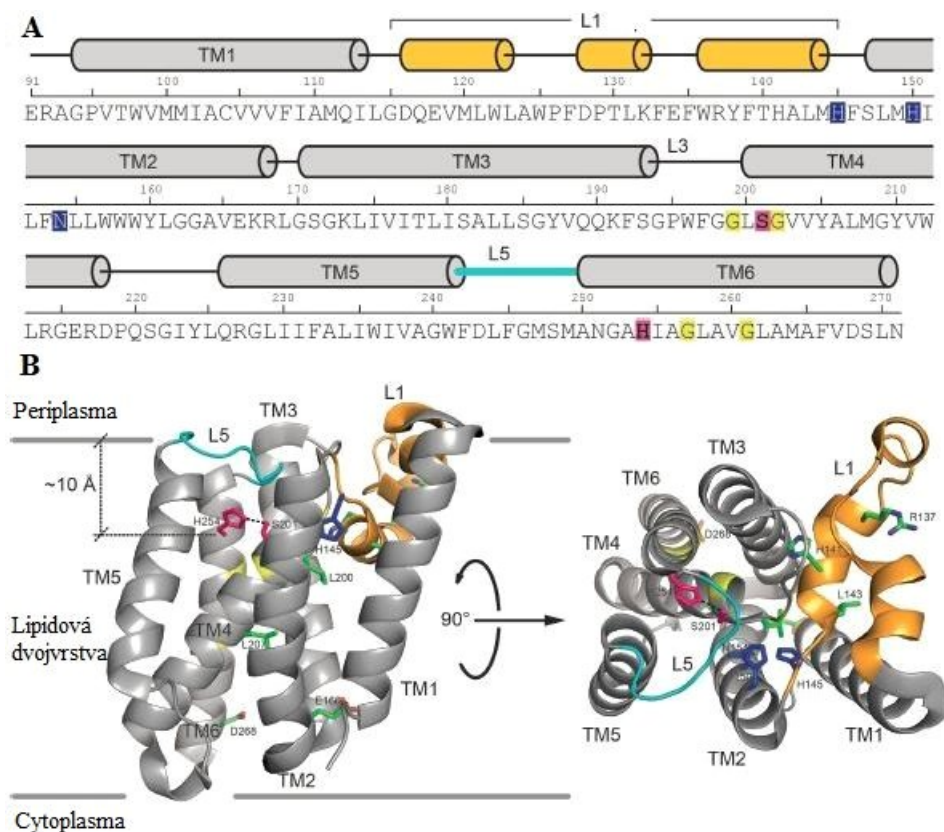
zbylými pěti TM doménami. Jednotlivé transmembránové domény jsou spojeny smyčkami L1–L5 (z angl. loop), které mají také vliv na strukturu a funkci enzymu [41] (Obr. 5).



**Obr. 5: Topologie transmembránové domény GlpG.** Šest hydrofobních  $\alpha$ -helixů je označeno TM1–TM6. Smyčky spojující jednotlivé  $\alpha$ -helixy jsou označeny L1–L5. Upraveno podle [41].

Aktivní místo se nachází přibližně 10 Å pod povrchem membrány. Katalytický histidin (H254) je umístěn na TM6. Katalytický serin (S201) je umístěn na mírně nakloněné TM4, takže se nachází přímo na dně mělké hydrofilní dutiny tvořící aktivní místo. Postranní řetězce obou katalytických aminokyselin jsou vzájemně propojeny silnou vodíkovou vazbou [27, 41] (Obr. 6, str. 17). Vzhledem k vlastnostem aktivního místa, které je „otevřené“ do prostředí vodného roztoku, může zřejmě docházet k difuzi molekul vody potřebné pro kompletní průběh mechanismu [42] do místa katalýzy.





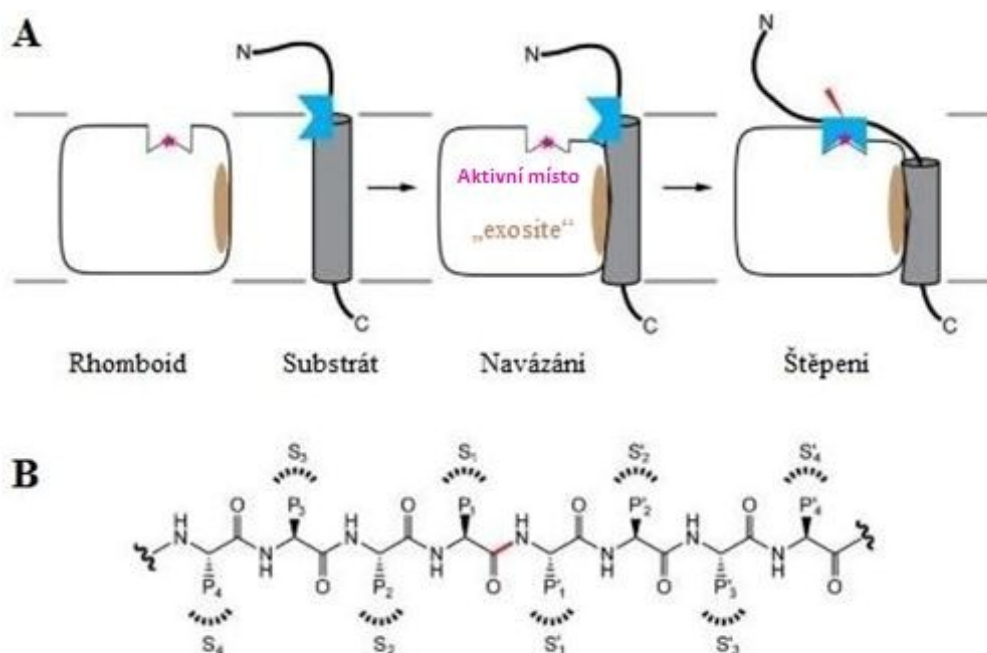
**Obr. 6: Sekvence a rentgenová struktura GlpG z *E. coli*.** **A)** Sekvence GlpG z *E. coli* odpovídající transmembránovým helixům TM1–TM6 (zobrazeny jako šedé válce) a smyčkám L1–L5 (L1 zobrazena oranžovou, L5 azurovou, zbylé černou barvou). Konzervované aminokyseliny jsou zvýrazněny modrou a žlutou barvou a katalytická dyáda (S201 a H254) je zvýrazněna růžovou barvou. **B)** Boční a vrchní pohled na rentgenovou strukturu GlpG z *E. coli* (PDB ID: 2XOV) vizualizovaný v barvách odpovídající popisu v sekci A (L1–L4 smyčky a konzervované aminokyseliny). Katalytická dyáda (zobrazena růžovou barvou) je umístěna přibližně 10 Å pod povrchem membrány a vodíková vazba mezi nimi je zobrazena jako černá tečkovaná čára. Smyčka L5 (zobrazena azurovou barvou) překrývající aktivní místo je dobře viditelná na vrchním pohledu. Aminokyseliny přispívající k termodynamické stabilitě jsou zobrazeny jako zelené tyčinky. Upraveno podle [43].

### 1.1.3.2 Substrátová specifita

Bylo zjištěno, že GlpG rozpoznává ve svých substrátech dva prvky. Prvním je hydrofobní helikální transmembránová doména (TMD), druhým prvkem je lineární sekvence asi šesti aminokyselin vážících se do aktivního místa (také nazývaná „rozpознаvací motiv“), která určuje místo štěpení. „Rozpoznávací motiv“ může a nemusí být součástí TMD, tyto dva prvky jsou tudíž od sebe oddělitelné [44].

Pokusy naznačují, že k samotnému navázání substrátu pak dochází ve dvou krocích [45, 46]. Nejdříve TMD substrátu interaguje s enzymem ve vazebném místě odděleném od aktivního místa (angl. „exosite“), což může být doprovázeno konformační změnou TMD substrátu vedoucí k druhému kroku. Ve druhém kroku se „rozpознаvací motiv“

naváže do aktivního místa enzymu a dojde k rozštěpení substrátu [44] (Obr. 7A). Názvosloví popisující vazbu substrátu v aktivním místě je zobrazeno na Obr. 7B.

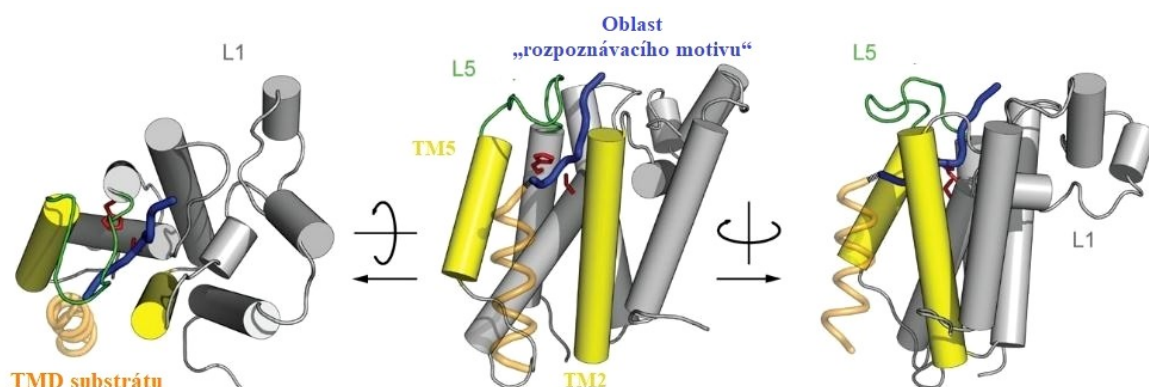


**Obr. 7: Schematické modely znázorňující vázání substrátu a popisující vazbu substrátu v aktivním místě rhomboidů. A)** Rhomboidy rozpoznávají ve svých substrátech dva prvky. Při vazbě nejprve TMD substrátu interaguje s enzymem v tzv. „exosite“ (zobrazeno hnědou barvou). Interakce může být spojena s destabilizací části TMD substrátu. Tato interakce umožňuje navázání „rozpoznávacího motivu“ (zobrazen modrou barvou) do aktivního místa enzymu (zobrazeno růžovou barvou). Místo štěpení je zobrazeno červeným klínkem. **B)** Tradiční názvosloví zbytků substrátu a jejich interakčních míst v enzymu [47]. Zbytky aminokyselin obklopujících peptidovou vazbu (zobrazena červenou barvou) jsou od tohoto místa na jednu stranu označeny P1–Pn a na druhou P1'–Pn'. Vazebná podmísta enzymu, která s nimi v aktivním místě interagují, jsou označena odpovídajícím způsobem, tedy S1–Sn a S1'–Sn'. Upraveno podle [48].

Bližší náhled na vazbu substrátu v aktivním místě a substrátovou specifitu umožnila rentgenová krystalografická struktura komplexu GlpG a peptidického inhibitoru odvozeného od substrátu. Tyto inhibitory byly odvozeny od přirozeného substrátu (TatA) rhomboidu z bakterie *Providencia stuartii*. Bylo zjištěno, že GlpG preferuje aminokyseliny v pozicích P5–P2' tohoto substrátu. Mutace aminokyselin v pozicích P5–P1 odhalily největší preference GlpG a díky kombinaci všech pěti mutací byla zjištěna nejvhodnější sekvence aminokyselin, RVRHA [49, 50]. Drobné modifikace této sekvence slouží k návrhu substrátů a později i inhibitorů v této bakalářské práci.

Oblast „rozpoznávacího motivu“ je tak mnohem lépe prozkoumána na rozdíl od rozpoznání TMD substrátu, kde se předpokládá, že roli vazebného místa („exosite“)

mohou hrát postranní řetězce v TM2 a TM5 [50]. Pohled na hypotetické umístění substrátu interagujícího s GlpG poskytuje Obr. 8.



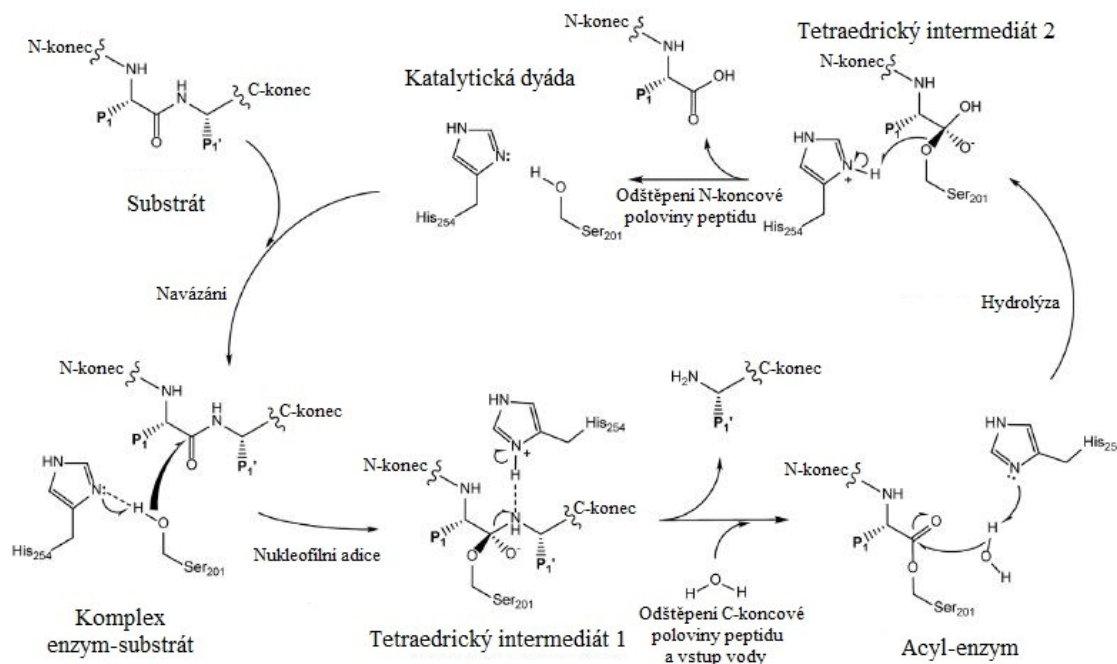
**Obr. 8:** Tři pohledy na model komplexu GlpG s fragmentem P4–P3' substrátu *Tata* z *Providencia stuartii* [50] navázaného na zbytek TMD substrátu. Model vznikl na základě krystalové struktury komplexu GlpG s inhibítor Ac-IATA-chloromethylketon a molekulárním modelováním a dynamikou. Fragment *Tata* substrátu (zobrazen modře) je přerušovanou čarou spojen se zbytkem TMD substrátu (zobrazena oranžově). Katalytická dyáda je zobrazena červeně. Jednotlivé  $\alpha$ -helixy jsou označeny TM1–TM6. Žlutě zvýrazněné TM2 a TM5 se spolu se zeleně zobrazenou smyčkou L5 nejspíše podílí na vazbě substrátu a vstupu do aktivního místa. Upraveno podle [48].

### 1.1.3.3 Katalytický mechanismus

Jak již bylo zmíněno, proteiny z rodiny rhomboidů včetně GlpG využívají pro hydrolýzu katalytickou dyádu (serin a histidin), oproti klasické a běžnější triádě (serin, histidin a kyselina asparagová) přítomné u klasických serinových proteas [28, 29]. U GlpG je to přesně S201 a H254.

Celou reakci lze shrnout takto: nejprve se substrát váže do aktivního místa, kde se karbonylový uhlík štěpené vazby nachází blízko nukleofilního S201. Dusík z postranního řetězce H254 přijímá vodík z OH skupiny S201, který se tím stane nukleofilem a atakuje karbonylový uhlík štěpené vazby. Dvojice elektronů z dvojné vazby karbonylového kyslíku se přesune na kyslík a z karbonylového uhlíku štěpené vazby se vytvoří tetraedrický intermediát 1. Elektrony, které se předtím přesunuly z karbonylové dvojné vazby, se nyní pohybují zpět od negativního kyslíku, čímž vzniká znovu dvojná vazba a dochází k odštěpení C-koncové poloviny peptidu a vzniku meziproductu acyl-enzymu. Nyní vstupuje do reakce voda. Dusík H254 přijímá vodík z vody, tím ji aktivuje a dochází k nukleofilní adici hydroxylového aniontu na elektrofilní atom uhlíku karbonylové skupiny. Elektrony z dvojné vazby se přesouvají na kyslík a dochází k vzniku tetraedrického intermediátu 2. Následně dochází opět k přesunu elektronů z kyslíku,

vytvoření dvojné vazby a tudíž k odštěpení N-koncové poloviny peptidu a k regeneraci katalytické dyády [51, 52] (Obr. 9).

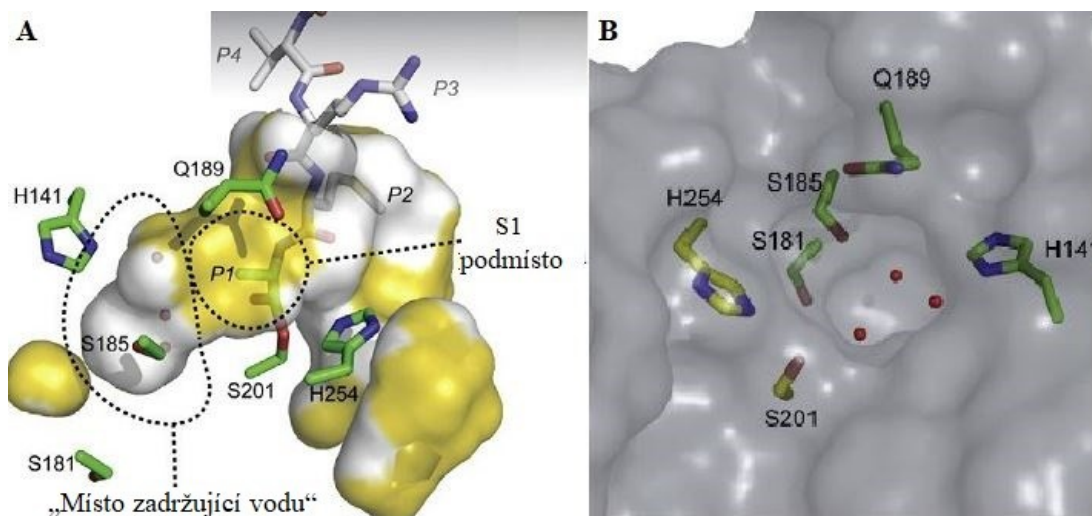


**Obr. 9: Reakční cyklus znázorňující mechanismus štěpení substrátu rhomboidem GlpG.** Po navázání substrátu do aktivního místa dochází ke vzniku komplexu enzym-substrát a následné nukleofilní adici za vzniku tetraedrického intermediátu 1. Po přesunu elektronů a opětovnému vzniku dvojné vazby dochází k odštěpení C-koncové poloviny peptidu. Dále dochází k nukleofilní adici vody za vzniku acyl-enzymu. Touto hydrolyzou vzniká tetraedrický intermediát 2. Po přesunu elektronů a opětovném vzniku dvojné vazby dochází k odštěpení N-koncové poloviny peptidu a obnovení katalytické dyády GlpG. Upraveno podle [53].

Později se ukázalo, že přívod vody do aktivního místa zřejmě není zajištěn pouze prostou difúzí, jak se zpočátku zdálo [42]. Provedené studie [54] totiž přináší pozoruhodné zjištění, že přístup molekul vody nutných pro katalýzu je usnadňován „štafetou“ polárních aminokyselin H141, S181, S185 a Q189, která vede z povrchu proteinu (Q189) až do tzv. „místa zadržujícího vodu“ v bezprostřední blízkosti katalytické dyády a S1 podmísta (Obr. 10B, str. 21). Molekuly vody jsou zde stabilizovány tvorbou vodíkových vazeb s okolními polárními skupinami zmíněných aminokyselin. Tento model byl podpořen mutacemi (hlavně Q189 a S185), kdy došlo k výraznému snížení aktivity enzymu bez vlivu na jeho stabilitu [54].

Bližší pohled na model komplexu GlpG s peptidyl aldehydovým inhibitorem Ac-VRMA-cho (Obr. 10A, str. 21) ukazuje, že „místo zadržující vodu“ tvoří s S1 podmístem GlpG kontinuální dutinu, která je podstatně větší než postranní řetězec alaninu, který je v P1 pozici substrátů GlpG silně preferován [50]. Nabízí se tedy hypotéza, že

optimalizace zbytku v P1 pozici tak, aby využil většinu interakcí s celým povrchem této dutiny, by mohla umožnit návrh účinnějších inhibitorů rhomboidů.



**Obr. 10:** Pohled na vazbu substrátu v aktivním místě GlpG s detailním pohledem na tzv. „místo zadržující vodu“. **A)** Prostorový vztah „místa zadržujícího vodu“ a S1 podmísta GlpG (oba označeny přerušovanými čarami) tvořících kontinuální dutinu ve struktuře komplexu GlpG s peptidyl aldehydovým inhibitorem Ac-VRMA-cho. Hydrofobní povrch S1 podmísta je zobrazen žlutě, v tzv. „místě zadržujícím vodu“ se nachází molekuly vody (zobrazeny červeně). Postranní řetězce stabilizující molekuly vody, katalytická dyáda a zbytek aminokyseliny v P1 pozici jsou zobrazeny zeleně. Zbytek peptidu je zobrazen šedě. **B)** Detailní pohled na tzv. „místo zadržující vodu“, kde jsou postranní řetězce stabilizující molekuly vody (zobrazeny červeně) zobrazeny zeleně a katalytická dyáda je zobrazena žlutě. Proteinové pozadí je zobrazeno šedě. Upraveno podle [53].

## 1.1.4 Inhibitory rhomboidů

S objevem rhomboidových proteas se postupně rozvíjel i výzkum týkající se jejich inhibitorů.

### 1.1.4.1 První generace inhibitorů

Fakt, že jediné inhibitory schopné inhibovat Rhomboid 1 z *Drosophila melanogaster* byly 3,4-dichloroisokumarin (DCI) (Obr. 11A, str. 22) a tosyl fenylalanyl chloromethylketon (TPCK) ve vysokých koncentracích, přispěl ke klasifikaci rhomboidů jako nové serinové proteasy [6]. Další zástupci jako fosfonofluoridáty (Obr. 11B, str. 22) či isokumariny jsou vysoce reaktivní a inhibují i ostatní serinové proteasy, takže nejsou selektivní [55, 56].

V další fázi byla testována knihovna asi 60 000 sloučenin, kdy byly s využitím rekombinantního rhomboidu a fluorogenního peptidového substrátu objeveny monocyklické  $\beta$ -laktamy (Obr. 11C, str. 22), jakožto nové inhibitory rhomboidů. Ty vykazují selektivitu vůči GlpG a AarA nad serinovou proteasou chymotrypsinem. Ovšem

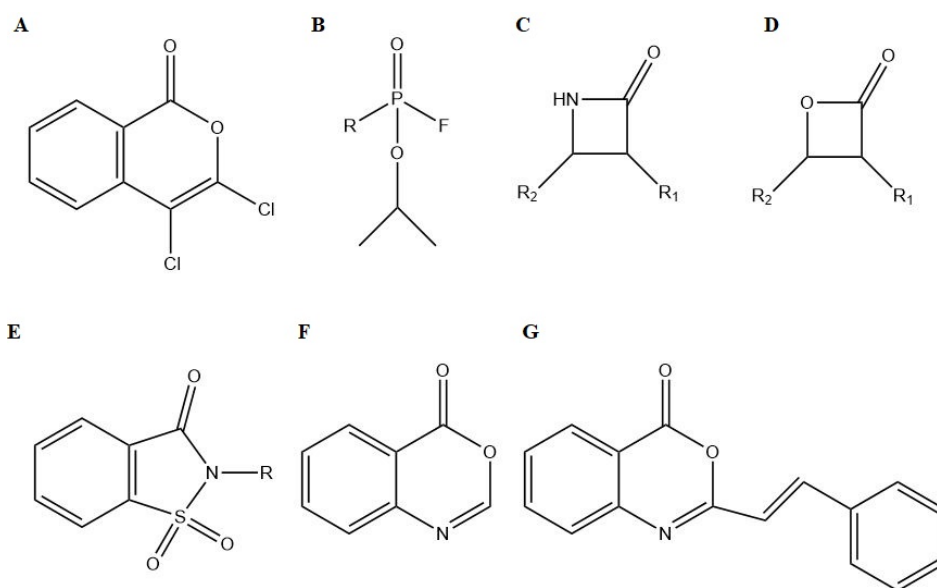


jejich omezením je aktivita *in vivo*, která ani při vyšších koncentracích nestačí na úplnou inhibici. To je nejspíše způsobeno inaktivací inhibitoru mechanismem inhibice a postupnou degradací v buňkách [57].

Další skupinou inhibitorů jsou  $\beta$ -laktony (Obr. 11D), které jsou strukturálně podobné  $\beta$ -laktamům. Ty ovšem dosahují vysokých hodnot  $IC_{50}$  (z angl. inhibitory concentration; koncentrace inhibitoru, která je nutná pro 50% inhibici enzymu *in vitro* [58]) a jsou tudíž slabými inhibitory [59].

Z nově objevených inhibitorů se do této skupiny svojí strukturou řadí i N-methylen sachariny (Obr. 11E). Tyto inhibitory působí již v nízkých mikromolárních koncentracích jak *in vitro*, tak *in vivo* v buňkách *E. coli* a jsou podstatně selektivnější vůči lidským serinovým hydrolasám než isokumariny. Teprve se ukáže, zdali bude možné jejich derivatizací docílit silnějších inhibičních účinků a selektivity [60].

Mezi poslední členy řadící se do této skupiny patří benzoxazin-4-ony (Obr. 11F). Tyto látky nejsou příliš silnými inhibitory rhomboidů, ale je možné je připravit jednostupňovou syntézou z komerčně dostupných a nepříliš nákladných výchozích látek, a je tudíž možné, že rozsáhlé variace tohoto skeletu by mohly vést ke zvýšení účinnosti a selektivity vůči rhomboidům [61]. Jednu takovou představuje velmi nedávno objevený 2-styryl-benzoxazin-4-on (Obr. 11G) mající mírnou účinnost, ale poskytující rozsáhlé možnosti strukturní variace [62].



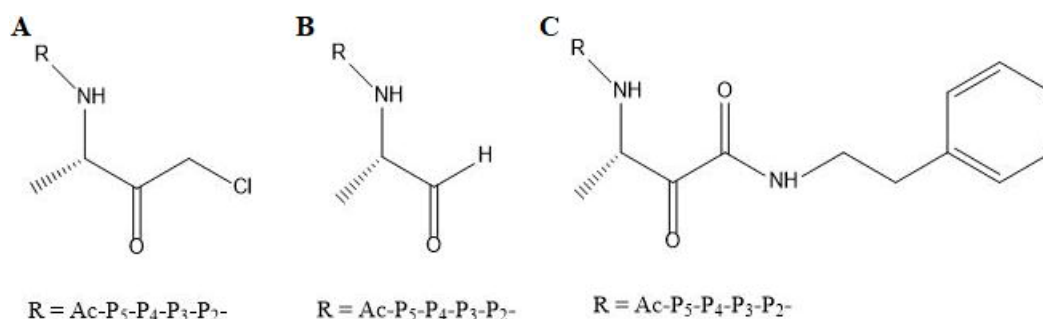
**Obr. 11: První generace inhibitorů rhomboidů. A) Isokumarin DCI. B) Fosfonofluoridáty. C)  $\beta$ -laktamy. D)  $\beta$ -laktaktony. E) N-methylen sachariny. F) Benzoxazin-4-on. G) 2-styryl-benzoxazin-4-on. Upraveno podle [53, 60-62].**

### 1.1.4.2 Inhibitory odvozené od substrátu

Druhou skupinou inhibitorů jsou inhibitory odvozené od substrátu, které vznikly ve snaze blíže porozumět substrátové specifitě a preferovaným sekvencím v aktivním místě rhomboidových proteas [44].

Vůbec prvními byly peptidyl chloromethylketony (Obr. 12A), jejichž krystalové struktury poskytly náhled do vazby substrátu v aktivním místě a také odhalily jeho preference v pozicích P1–P5 [50]. O něco později se objevily peptidyl aldehydy (Obr. 12B) [46]. Podle hodnot  $IC_{50}$  patří obě skupiny mezi slabé inhibitory s nízkou selektivitou. Společně však poskytují dostatečný podklad pro další inhibitory s peptidovou sekvencí spojenou s vhodnou elektrofilní hlavicí [46, 50].

Výše zmíněné podklady byly využity při objevení dalších členů této skupiny. Jsou jimi peptidyl  $\alpha$ -ketoamidy se substitucí hydrofobními skupinami na amidovém dusíku (Obr. 12C). Ty patří mezi silné inhibitory s nanomolárními hodnotami  $IC_{50}$ , vysokou selektivitou a díky skutečnosti, že tyto typy sloučenin se klinicky používají jako léčiva proti viru hepatitidy C [63], mají všechny předpoklady pro využití v buněčné biologii a případném vývoji léčiv cílených na rhomboidy [64].



**Obr. 12: Inhibitory rhomboidů odvozené od substrátu. A) Peptidyl chloromethylketony. B) Peptidyl aldehydy. C) Peptidyl  $\alpha$ -ketoamidy. Upraveno podle [48, 64].**

#### 1.1.4.2.1 Možnosti vylepšení peptidyl $\alpha$ -ketoamidů

GlpG silně preferuje v P1 pozici aminokyselinu alanin [50], ovšem S1 podmísto tvořící dutinu s „místem zadržujícím vodu“ se zdá být schopno pojmout větší aminokyselinové zbytky [54], viz taky kapitola 1.1.3.3. Vzhledem k tomuto zjištění by možným vylepšením peptidyl  $\alpha$ -ketoamidů mohly být v P1 pozici různě prodloužené deriváty alaninu, které by byly schopny interagovat s polární částí této dutiny obsahující

„místo zadržující vodu“. Prozkoumání možností vylepšení inhibitorů v tomto směru je náplní této bakalářské práce.



## 2 Cíle práce

- Exprimovat rhomboid GlpG v buňkách *E. coli* a purifikovat jej.
- Charakterizovat vliv záměn v P1 pozici substrátů na účinnost jejich štěpení rhomboidem GlpG.
- Prozkoumat vliv vybraných aminokyselin v P1 pozici peptidyl  $\alpha$ -ketoamidů na jejich inhibiční vlastnosti.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Použité chemikálie a ostatní materiál

Gen pro syntézu rhomboidu GlpG ve vektoru pET25b+	laboratoř školitele
Buňky C41(DE3) <i>E. coli</i>	Lucigen, USA
LB médium	Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin	Sigma
IPTG	Biosynth AG, Švýcarsko
Tekutý dusík	Messer, Německo
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
NaOH	Penta, Česká republika
Glycerol	Penta, Česká republika
NaCl	Sigma-Aldrich, USA
KCl	Penta, Česká republika
MgCl <sub>2</sub>	Penta, Česká republika
MgSO <sub>4</sub>	Penta, Česká republika
Trypton	VWR Chemicals, USA
D-glukosa	Penta, Česká republika
Kvasničný extrakt	VWR Chemicals, USA
Imidazol	Sigma-Aldrich, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, USA
EDTA-free protease inhibitor mix tablet (cOmplete™)	Sigma-Aldrich, USA
DDM	Anatrace, USA

Tris	Sigma-Aldrich, USA
HCl	Penta, Česká republika
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
SDS	Bio-Rad, USA
Glycerol	Penta, Česká republika
$\beta$ -merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Blue G-250	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina octová	Penta, Česká republika
40% Akrylamid	Bio-Rad, USA
2% Bis-Akrylamid	Bio-Rad, USA
TEMED	Carl Roth, Německo
APS	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Penta, Česká republika
Protein Ladder marker 10–200 kDa	New England BioLabs, USA
Bezvodý DMSO	Thermo Scientific, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, USA

Všechny pufrы a barvicí roztok Razor Blue byly filtrovány přes membránu s velikostí pórů 0,22  $\mu$ m (Carl Roth, Německo).

LB médium: 20 g LB média rozpuštěno v 1 l deionizované vody, autoklávováno.

SOC médium: 2 g tryptonu, 0,5 g kvasničného extraktu, 1 ml 1M NaCl, 0,25 ml 1M KCl, 1 ml 1M MgCl<sub>2</sub>, 1 ml 1M MgSO<sub>4</sub>, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, autoklávováno. K takto připraveným 100 ml byly přidány 2 ml 1M roztoku glukosy (18,02 g doplněno do 100 ml destilovanou vodou), filtrováno přes membránu s velikostí pórů 0,22  $\mu$ m (Carl Roth, Německo).

Fluorogenní substráty (KSp65, KSp72, KSp73, KSp74, KSp75, KSp86, KSp97, KSp98, KSp99a, KSp99b), fluorogenní transmembránové substráty (KSp35, KSp76) a inhibitory (STS1002, STS898a, STS972a, STS972b) byly připraveny v laboratoři školitele (Dr. Stanchev).

### 3.1.2 Použité přístroje a pomůcky

Vodní lázeň	Benchmark Scientific, USA
Třepací blok Thermomixer	Eppendorf, Německo
Skleněné kuličky	P-LAB, Česká republika
Inkubátor IPP 400	Memmert, Německo
Rotační inkubátor Innova 44/44R	New Brunswick Scientific, USA
Spektrofotometr BioSpectrometer® kinetic	Eppendorf, Německo
Centrifuga Avanti J-30I	Beckman Coulter, USA
Mrazák Ultra-Low (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
Dounce homogenizátor	Sigma-Aldrich, USA
Homogenizátor EmulsiFlex®-C3	Avestin, Kanada
Centrifuga Optima L-90K	Beckman Coulter, USA
Válečkové míchadlo SRT6D	Stuart, Velká Británie
Nosič TALON™ Metal Affinity Resin	Clontech Laboratories, USA
Centrifuga Allegra X-15R	Beckman Coulter, USA
Kolonka na nosič TALON™	Thermo Scientific, USA
Mrazák Comfort (-20 °C)	Liebherr, Německo
Odsolovací kolonka PD-10	GE Healthcare, Velká Británie
Zakoncentrovávací kolonka Vivaspin 20	Sartorius Stedim Biotech, Německo
Spektrofotometr NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, USA
Aparatura na SDS elektroforézu	Bio-Rad, USA

Filtrační papír	Macherey-Nagel, Německo
Mikrovlnná trouba Wavedom	LG, Jižní Korea
Horizontální míchadlo KS 260	IKA, Německo
Scanner EPSON perfection V37	EPSON, Japonsko
Analytické váhy XA 110/X	Radwag, Polsko
Mrazák Comfort (-20 °C)	Liebherr, Německo
Centrifuga Eppendorf 5424	Eppendorf, Německo
Mikrotitrační destičky 96 jamek	Greiner Bio-One, Rakousko
Čtečka destiček TECAN infiniteM1000	TECAN, Rakousko
Program GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc.
Filtrační membrány 0,22 µm	Carl Roth, Německo
Autokláv MLS-3020U	Sanyo, Japonsko

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Exprese proteinu

#### 3.2.1.1 Transformace chemicky kompetentních buněk plasmidem

Gen pro syntézu rhomboidu GlpG, jenž obsahuje na C-konci histidinovou kotvu, umístěný ve vektoru pET25b+ s rezistencí na ampicilin (AMP) (připraven v laboratoři školitele), byl metodou teplotního šoku zaveden do chemicky kompetentních buněk C41(DE3) *E. coli* (Lucigen). 1 µl tohoto obdrženého plasmidu o koncentraci 136 µg/µl byl přidán k 20 µl kompetentních buněk *E. coli*. Buňky s vektorem byly ponechány na ledu po dobu 30 minut. Poté byla směs podrobena teplotnímu šoku ve vodní lázni (Benchmark Scientific) při 42 °C po dobu 45 sekund a následně ihned inkubována na ledu po dobu 2 minut. Po této inkubaci bylo ke směsi přidáno 200 µl předeřátého SOC média a buňky byly inkubovány v třepacím bločku Thermomixer (Eppendorf) při 37 °C a 600 RPM (z angl. revolutions per minute) po dobu 60 minut. Následně byla směs přemístěna na misku s LB (z angl. Luria-Bertani) agarom (Sigma-Aldrich), který obsahoval selekční

antibiotikum ampicilin (Sigma-Aldrich) o koncentraci 100 µg/ml. Plotna s nátěrem buněčné suspenze byla ponechána přes noc při 37 °C v inkubátoru IPP 400 (Memmert), aby narostly kolonie bakterií nesoucích plasmid a tudíž rezistentních na ampicilin.

### **3.2.1.2 Exprese rekombinantního proteinu GlpG v *E. coli***

Několik reprezentativních kolonií z misky bylo zaočkováno do 50 ml LB média (Sigma-Aldrich) s AMP (Sigma-Aldrich) o koncentraci 100 µg/ml a zaočkované médium bylo inkubováno přes noc při 37 °C a 220 RPM v rotačním inkubátoru Innova 44/44R (New Brunswick Scientific). Následující den byla na spektrofotometru BioSpectrometer® kinetic (Eppendorf) změřena hodnota OD<sub>600</sub> (optická hustota při vlnové délce 600 nm) tohoto inokula inkubovaného přes noc. Její hodnota byla přibližně 3,6 a toto médium bylo zředěno do Erlenmayerovy baňky s 1 l LB média a AMP o koncentraci 100 µg/ml tak, aby hodnota OD<sub>600</sub> byla přibližně 0,05 (celkem bylo tímto způsobem zaočkováno 8 l média). Obsah Erlenmayerovy baňky byl inkubován za stejných podmínek, dokud hodnota OD<sub>600</sub> nedosáhla hodnoty přibližně 0,4. Poté byla indukována exprese rhomboidu přidáním IPTG (Biosynth AG) do 0,5 mM. Médium bylo následně inkubováno při 20 °C a 220 RPM v rotačním inkubátoru Innova 44/44R (New Brunswick Scientific) přes noc. Následující den byla opět změřena OD<sub>600</sub>, její hodnota činila přibližně 3,2. Obsah Erlenmayerovy baňky byl centrifugován (5000 × g; 15 min; 4 °C; rotor JLA-9.1000; centrifuga AVANTI J-30I; Beckman Coulter). Buněčná peleta byla zmrazena v tekutém dusíku (Messer) a uložena při -80 °C v mrazáku Ultra-Low (Sanyo) do dalšího zpracování (viz kapitola 3.2.2).

### **3.2.2 Izolace membránových proteinů**

#### **Složení použitých roztoků:**

Pufr A: 20 mM HEPES-NaOH pH 7,4; 10% (v/v) glycerol; 100 mM NaCl

Pufr B: 20 mM HEPES-NaOH pH 7,4; 10% (v/v) glycerol; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol

Buněčná peleta byla rozpuštěna ve 200 ml A pufru s 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich) a 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich). Následně byly buňky homogenizovány v Dounce homogenizátoru (Sigma-Aldrich) a třikrát po sobě rozrušeny v přístroji EmulsiFlex®-C3 (Avestin) při 4 °C za tlaku 1100 barů. Poté byla provedena centrifugace

buněčného lyzátu k odstranění zbytků buněk ( $15000 \times g$ ; 30 min; 4 °C; rotor JA-25.50; centrifuga Avanti J-30I; Beckman Coulter) a následně ultracentrifugace supernatantu k získání buněčných membrán v peletě ( $100000 \times g$ ; 2 h; 4 °C; rotor 45 Ti; centrifuga Optima L-90K; Beckman Coulter). Peleta byla následně rozsuspendována ve 2 ml B pufru s rozpuštěnou tabletou inhibitorů proteas cOmplete™ EDTA-free (Sigma-Aldrich) (1 tableta rozpuštěna v 50 ml B pufru). Poté byla stanovena koncentrace proteinů metodou Pierce 660 nm Protein Assay na spektrofotometru BioSpectrometer® kinetic (Eppendorf), její hodnota činila přibližně 28 mg/ml. Buněčné membrány byly naředěny B pufrem s proteasovými inhibitory na koncentraci přibližně 5 mg/ml a následně k nim byl přidán 20% (w/v) roztok detergentu DDM (Anatrace) v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace byla 1,5% (w/v). Takto vzniklý roztok byl poté 1,5 hodiny při laboratorní teplotě inkubován na válečkovém míchadle SRT6D (Stuart). Nesolubilizované proteiny, precipitát a zbytky membrán byly odděleny od solubilizovaných proteinů (supernatant) ultracentrifugací ( $100000 \times g$ ; 30 min; 4 °C; rotor 45 Ti; centrifuga Optima L-90K; Beckman Coulter). Při všech centrifugacích byly odebírány vzorky pelet a supernatantů kvůli kontrole rozpustnosti proteinu a účinnosti solubilizace (viz kapitola 3.2.6).

### **3.2.3 Afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech**

#### **Složení použitých roztoků:**

Pufr C: 20 mM HEPES-NaOH pH 7,4; 10% (v/v) glycerol; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; 0,05% (w/v) DDM

Pufr promývací W1: 20 mM HEPES-NaOH pH 7,4; 10% (v/v) glycerol; 300 mM NaCl; 25 mM imidazol; 0,05% (w/v) DDM

Pufr promývací W2: 20 mM HEPES-NaOH pH 7,4; 10% (v/v) glycerol; 300 mM NaCl; 50 mM imidazol; 0,05% (w/v) DDM

Pufr eluční EL1: 20 mM HEPES-NaOH pH 7,4; 10% (v/v) glycerol; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol; 0,05% (w/v) DDM

Pufr eluční EL2: 20 mM HEPES-NaOH pH 7,4; 10% (v/v) glycerol; 300 mM NaCl; 350 mM imidazol; 0,05% (w/v) DDM

K purifikaci GlpG ze supernatantu z předchozího kroku (viz kapitola 3.2.2) pomocí afinitní chromatografie byl využit nosič s imobilizovanými kobaltnatými ionty, který vykazuje vysokou specifitu k histidinovým zbytkům. Nejprve byl 1 ml nosiče TALON<sup>TM</sup>Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories) centrifugován ( $2000 \times g$ ; 2 min; 4 °C; centrifuga Allegra X-15R; Beckman Coulter), aby došlo k oddělení 20% ethanolu, v němž je uchováván, a dále promyt za stejných podmínek 10 ml destilované vody. Poté byl nosič přelit do kolonky (Thermo Scientific) a ekvilibrován 10 ml pufru C a následně byl na kolonu nanesen supernatant za současného jímání filtrátu, obsahujícího nenavázané proteiny. Z filtrátu bylo odebráno 12,5  $\mu$ l vzorku (F1) a tento krok byl zopakován. Opět bylo odebráno 12,5  $\mu$ l vzorku (F2). Dále byla kolona promyta 8 ml pufru C za současného jímání filtrátu, z filtrátu byl odebrán vzorek (pufr C) a stejný postup byl zopakován s pufrů W1 a W2 (vzorky W1 a W2), čímž byly odstraněny nenavázané nebo velmi slabě vázané proteiny. Následně byl navázaný rhomboid eluován čtyřikrát 2,5 ml elučního pufru EL1 a z každé frakce byly odebrány vzorky (EL1I–EL1IV). Totéž bylo zopakováno s druhým elučním pufrům EL2 a rovněž byly odebrány vzorky (EL2I–EL2IV). Na závěr bylo odebráno i 5  $\mu$ l nosiče. Všechny frakce rhomboidu byly zamrazeny v tekutém dusíku (Messer) a uloženy při -20 °C v mrazáku Comfort (Liebherr), dokud nebyly zanalyzovány vzorky z této metody (viz kapitola 3.2.6).

### 3.2.4 Odsolování

**Složení použitého roztoku:**

Finální pufr: 20 mM HEPES-NaOH pH 7,4; 10% (v/v) glycerol; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM

Vysoká koncentrace imidazolu zvyšuje riziko precipitace rhomboidu, proto bylo nutné odstranit ho z elučních frakcí. Nejprve byla odsolovací kolonka PD-10 (GE Healthcare) ekvilibrována 25 ml finálního pufru. V dalším kroku byla kolona naplněna vzorkem (eluční frakce), který byl následně eluován 3,5 ml finálního pufru.

### 3.2.5 Koncentrování GlpG

Takto odsolený roztok rhomboidu bylo nutné koncentrovat na přibližně 1 mg/ml. K tomu byla využita kolonka Vivaspin 20 (Sartorius Stedim Biotech), jejíž MWCO



(z angl. molecular weight cut-off ) bylo 50 kDa. Nejdříve byla kolonka promyta vodou a finálním pufrem, následně byl nanesen vzorek. Centrifugace ( $4000 \times g$ ; 4 °C; centrifuga Allegra X-15R; Beckman Coulter) probíhala tak dlouho, dokud nedosahovala jeho koncentrace přibližně 1 mg/ml. Po centrifugaci byla zjištěna koncentrace rhomboidu pomocí přístroje Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Roztok rhomboidu byl rozdělen do mikrozkušavek po 0,5 ml, zmrazen v tekutém dusíku a uložen při -80 °C do dalšího zpracování (viz kapitoly 3.2.7.2 a 3.2.10).

### 3.2.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

#### Složení použitých roztoků:

Pufr SDS-PAGE (z angl. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis):  
25 mM Tris; 250 mM glycín; 0,1% (w/v) SDS

Vzorkový pufr SDS-PAGE (6×): 350 mM Tris pH 6,8; 50% (v/v) glycerol; 10% (w/v) SDS; 10% (v/v) β-merkapt ethanol; 0,05% (w/v) bromfenolová modř

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS byla použita pro kontrolu exprese proteinů v *E. coli*, účinnosti solubilizace při izolaci membránových proteinů a také při kontrole účinnosti afinitní chromatografie s cílem získat roztok čistého rhomboidu GlpG. Všechny vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem pro SDS-PAGE a inkubovány v bločku Thermomixer (Eppendorf) při 65 °C po dobu 15 minut. Pro elektroforézu byla použita aparatura (Bio-Rad), která byla složena dle návodu výrobce.

#### 3.2.6.1 Příprava gelů

V kádince byly smíchány komponenty pro přípravu 12% separačního polyakrylamidového gelu v množstvích odpovídajících dvěma gelům dle Tab. 1 (str. 34). Gel v aparatuře byl zalit 96% (v/v) ethanol (Penta) kvůli zamezení přístupu vzduchu. Po polymeraci gelu byl ethanol odlit a gel byl vysušen filtračním papírem (Macherey-Nagel). Následně byla na gel přilita vrstva 4% zaostřovacího gelu, jenž byl připraven smísením komponent dle Tab. 1. (str. 34). Do takto přilitého gelu byl vložen hřebínek s patnácti jamkami.

**Tab. 1: Složení 12% separačního a 4% zaostřovacího polyakrylamidového gelu odpovídající dvěma gelům.**

12% separační polyakrylamidový gel		4% zaostřovací polyakrylamidový gel	
40% Akrylamid [ml]	2,90	40% Akrylamid [ml]	0,39
2% Bis-Akrylamid [ml]	2,00	2% Bis-Akrylamid [ml]	0,21
4x rozdělovací pufr (1,5M Tris-HCl pH 8,8) [ml]	2,50	4x zaostřovací pufr (1M Tris-HCl pH 6,8) [ml]	1,00
10% (w/v) SDS [ml]	0,10	10% (w/v) SDS [ml]	0,04
Voda [ml]	2,40	Voda [ml]	2,34
TEMED [ $\mu$ l]	4,00	TEMED [ $\mu$ l]	3,20
10% (w/v) APS [ $\mu$ l]	100,00	10% (w/v) APS [ $\mu$ l]	40,00
Celkový objem [ml]	10,00	Celkový objem [ml]	4,00

### 3.2.6.2 Elektroforéza

V aparatuře byly gely zality pufrům SDS-PAGE. Vzorky byly nanášeny do jamek v objemu 10  $\mu$ l. Jako standard byl použit Protein Ladder marker 10–250 kDa (New England BioLabs), který byl nanášen v objemu 5  $\mu$ l. Elektroforéza probíhala 1 hodinu při 180 V.

### 3.2.6.3 Barvení proteinů v gelu

#### Složení použitého roztoku:

Razor Blue: 50 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma catalog number B-0770), 3 ml/l koncentrovaná kyselina octová (Penta)

Po proběhnutí elektroforézy byl z gelů odříznut 4% zaostřovací gel a separační gel byl vložen do misky, ve které probíhalo barvení. Nejdříve byl gel zalit přibližně 300 ml destilované vody a vařen v mikrovlnné troubě Wavedom (LG) na maximální výkon asi 1 minutu. Voda byla vylita, gel byl opláchnut destilovanou vodou, aby došlo k odstranění SDS, který brání barvení, a poté převrstven barvicím roztokem Razor Blue. S roztokem byl vařen za stejných podmínek v mikrovlnné troubě asi 30 sekund a poté jemně promícháván na horizontálním míchadle KS 260 (IKA) 5 minut při laboratorní teplotě. Po vylití roztoku byl gel opláchnut destilovanou vodou, zalit přibližně 300 ml destilované vody a vařen za stejných podmínek v mikrovlnné troubě asi 1 minutu. Po vylití vody byl stejným objemem převrstven a míchán ještě hodinu při laboratorní teplotě na horizontálním

míchadle. Nakonec byly gely vloženy do plastové fólie a naskenovány pomocí scanneru EPSON perfection V37 (EPSON).

### **3.2.7 Stanovení aktivity rhomboidu GlpG vůči fluorogenním substrátům s mutacemi v P1 místě**

#### **3.2.7.1 Příprava zásobních roztoků substrátů**

Deset fluorogenních transmembránových substrátů s modifikací v P1 pozici (připraveny v laboratoři školitele, Dr. Stanchev) bylo naváženo na analytických vahách XA 110/X (Radwag) a rozpuštěno v bezvodém DMSO (Thermo Scientific) v objemu odpovídajícím 20 mM roztoku. Přesná koncentrace takto vzniklých roztoků byla stanovena kvantitativní aminokyselinovou analýzou provedenou Ing. Součkem z analytické servisní laboratoře Ústavu organické chemie a biochemie (ÚOCHB).

#### **3.2.7.2 Příprava alikvotů rhomboidu GlpG**

Při opakovaném rozmrazování a zmrazování rhomboidu GlpG dochází ke snížení jeho aktivity. Proto byly připraveny jeho alikvoty o objemu 28  $\mu$ l, jenž byl přímo potřebný pro reakce. Purifikovaný GlpG uložený v mrazáku v -80 °C byl rychle rozmrazen ve vodní lázni (Benchmark Scientific) při 37 °C a následně v požadovaném objemu pipetován do mikrozkušavek. Mikrozkušavky byly zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy při -20 °C. Veškerá manipulace s rozmrazeným proteinem probíhala na ledu.

#### **3.2.7.3 Štěpení substrátů rhomboidem GlpG**

##### **Složení použitých roztoků:**

2x Pufr bez DMSO: 40 mM HEPES pH 7,4; 300 mM NaCl; 0,1% (w/v) DDM

1x Pufr s 20% (v/v) DMSO: 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM; 20% (v/v) DMSO

1x Pufr bez DMSO: 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM

Všechny reakce štěpení jednotlivých substrátů rhomboidem GlpG probíhaly ve 37 °C v pufru o složení 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM; 10% (v/v) DMSO. Koncentrace GlpG byla ve všech měřeních 0,4  $\mu$ M, koncentrace

jednotlivých substrátů byla různá v závislosti na koncentraci zásobních roztoků substrátů a jejich štěpitelnosti rhomboidem GlpG.

Roztok substrátu KSp86 o objemu 230  $\mu$ l a koncentraci 1 mM s 20% (v/v) DMSO byl připraven smísením komponent uvedených v Tab. 2 v mikrozkuhavce (hodnoty uvedené v Tab. 2 odpovídají přípravě roztoku substrátu KSp86, pro další substráty se hodnoty liší, neboť se lišily koncentrace jejich zásobního roztoku). Následně bylo z roztoku připraveno ředící řadou (1,5x) 9 mikrozkuhovek o objemu 75  $\mu$ l, kdy byl pro ředění použit 1x Pufr s 20% (v/v) DMSO.

**Tab. 2: Komponenty pro přípravu roztoku substrátu KSp86.**

2x Pufr bez DMSO [ $\mu$ l]	Voda [ $\mu$ l]	DMSO [ $\mu$ l]	Substrát KSp86 o koncentraci 10,7 mM [ $\mu$ l]
115,0	69,0	24,5	21,5

Roztok rhomboidu o objemu 300  $\mu$ l a koncentraci 0,8  $\mu$ M byl připraven přidáním 272  $\mu$ l 1x Pufru bez DMSO k alikvotu rhomboidu GlpG o objemu 28  $\mu$ l a koncentraci 8,6  $\mu$ M (viz kapitola 3.2.7.2) v mikrozkuhavce na ledu.

Všechny mikrozkuhavky byly krátce centrifugovány na stolní centrifuze Eppendorf 5424 (Eppendorf) a poté inkubovány v třepacím bločku Thermomixer (Eppendorf) při 37 °C a 500 RPM po dobu 30 minut.

Po inkubaci byly vzorky krátce centrifugovány na stolní centrifuze Eppendorf 5424 (Eppendorf) a následně bylo na předeřátou 96-jamkovou destičku (Greiner Bio-One) pod sebe do dvou řad napipetováno 25  $\mu$ l z každé zkuhavky se substrátem. K tomuto množství bylo do každé jamky v první řadě přidáno 25  $\mu$ l rhomboidu GlpG a do každé jamky v druhé řadě 25  $\mu$ l 1x Pufru bez DMSO sloužícího jako pozadí. Destička byla vložena do přístroje TECAN infiniteM1000 (TECAN) a po dobu 35 minut byla měřena fluorescence volného aminomethylkumarinu při vlnových délkách 355 nm (excitace) a 450 nm (emise). Ten vzniká rozštěpením amidové vazby, kterou je v substrátu vázán, rhomboidem GlpG. Ze závislosti fluorescence na čase byly v programu GraphPadPrism 7 (GraphPad Software) určeny počáteční rychlosti pro jednotlivé koncentrace substrátu.

### 3.2.8 Příprava zásobních roztoků inhibitorů

Testované inhibitory (připraveny v laboratoři školitele, Dr. Stanchev) byly naváženy na analytických vahách XA 110/X (Radwag) a rozpuštěny v bezvodém DMSO (Thermo Scientific) tak, aby měl výsledný roztok koncentraci 20 mM. Přesná koncentrace takto vzniklých roztoků byla stanovena kvantitativní aminokyselinovou analýzou provedenou Ing. Součkem z analytické servisní laboratoře ÚOCHB.

### 3.2.9 Příprava zásobních roztoků fluorogenních transmembránových substrátů KSp35 a KSp76

**Složení použitého roztoku:**

1x Pufr bez DDM: 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl

KSp35 a KSp76 (Tab. 3) jsou peptidy navržené podle membránové domény 2 proteinu LacY, proto jsou hydrofobní a nerozpustné ve vodě. Pro zvýšení jejich rozpustnosti [65] byly nejprve rozpuštěny v malém množství HFIP. Následně bylo HFIP odpařeno a peptidy byly znovu rozpuštěny v TFE na koncentraci 3 mM. Poté byly naředěny 0,05% (w/v) DDM tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 50  $\mu$ M. V dalším kroku byly připraveny alikvoty po 500  $\mu$ l (tj. 114  $\mu$ g KSp35, 123  $\mu$ g KSp76) a peptidy byly lyofilizovány. Tím byly získány peptidy zabudované v micelách DDM (připraveny v laboratoři školitele, Dr. Stanchev). Pro měření  $IC_{50}$  testovaných inhibitorů byly jednotlivé alikvoty peptidů opět rozpuštěny v 500  $\mu$ l 1x Pufru bez DDM. Výsledná koncentrace peptidů byla ověřena kvantitativní aminokyselinovou analýzou provedenou Ing. Součkem z analytické servisní laboratoře ÚOCHB.

**Tab. 3: Primární struktura substrátů KSp35 a KSp76 značených FRET páry edans-dabcyl (KSp35) a tamra-qxl610 (KSp76). Vazba S–D je štěpena rhomboidem GlpG.**

Substrát	Sekvence
KSp35	KRHDIN(E-edans)ISKs–DTG(K-dabcyl)IFAAISLFSLLFQPLFGLSKK
KSp76	KRHDIN(K-tamra)ISKs–DTG(C-qxl610)IFAAISLFSLLFQPLFGLSKK

### 3.2.10 Příprava alikvotů rhomboidu GlpG

Při opakovaném rozmrazování a zmrazování rhomboidu GlpG dochází ke snížení jeho aktivity. Proto byly připraveny jeho alikvoty o objemu 80  $\mu$ l, jenž byl přímo potřebný pro reakce. Purifikovaný GlpG uložený v mrazáku v -80 °C byl rychle rozmrazen ve vodní lázni (Benchmark Scientific) při 37 °C a následně v požadovaném objemu pipetován do mikrozkušavek. Mikrozkušavky byly zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy při -20 °C. Veškerá manipulace s rozmrazeným proteinem probíhala na ledu.

### 3.2.11 Měření inhibice GlpG syntetickými inhibitory

#### Složení použitých roztoků:

2x Pufr bez DMSO: 40 mM HEPES pH 7,4; 300 mM NaCl; 0,1% (w/v) DDM

1x Pufr s 20% (v/v) DMSO: 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM; 20% (v/v) DMSO

1x Pufr s 10% (v/v) DMSO: 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM; 10% (v/v) DMSO

1x Pufr bez DMSO: 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM

Všechny inhibované reakce štěpení substrátu KSp35 rhomboidem GlpG byly prováděny při 37 °C, za 0,3  $\mu$ M koncentrace rhomboidu, 10  $\mu$ M koncentrace substrátu KSp35 a různých koncentrací jednotlivých inhibitorů, přičemž prostředí reakce bylo ve všech reakcích stejné, a sice 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM; 8% (v/v) DMSO.

Roztok inhibitoru STS1002 o objemu 100  $\mu$ l a koncentraci 125  $\mu$ M s 20% (v/v) DMSO byl připraven smísením komponent uvedených v Tab. 4 v mikrozkušavce (hodnoty uvedené v Tab. 4 odpovídají přípravě roztoku inhibitoru STS1002, pro další inhibitory se hodnoty liší, neboť se lišily koncentrace jejich zásobních roztoků). Následně bylo z roztoku připraveno dvojnásobnou ředící řadou 16 mikrozkušavek o objemu 30  $\mu$ l, kdy pro ředění byl použit 1x Pufr s 20% (v/v) DMSO.

*Tab. 4: Komponenty pro přípravu roztoku inhibitoru STS1002.*

2x Pufr bez DMSO [ $\mu$ l]	Voda [ $\mu$ l]	DMSO [ $\mu$ l]	Inhibitor STS1002 o koncentraci 5mM [ $\mu$ l]
50,0	30,0	17,5	2,5

Roztok rhomboidu o objemu 860  $\mu\text{l}$  a koncentraci 0,8  $\mu\text{M}$  byl připraven přidáním 780  $\mu\text{l}$  1x Pufru bez DMSO k alikvotu rhomboidu GlpG o objemu 80  $\mu\text{l}$  a koncentraci 8,6  $\mu\text{M}$  (viz kapitola 3.2.10) v mikrozkuhavce na ledu. Tento roztok byl opatrně promíchán špičkou a do každé mikrozkuhavky s roztokem inhibitoru bylo přidáno 30  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku a dalších 90  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku bylo odpipetováno do nové mikrozkuhavky, kde k němu bylo přidáno 90  $\mu\text{l}$  1x Pufru s 20% (v/v) DMSO.

Všechny mikrozkuhavky se vzorky byly krátce centrifugovány na stolní centrifuze Eppendorf 5424 (Eppendorf) a poté spolu se 180  $\mu\text{l}$  1x Pufru s 10% (v/v) DMSO v mikrozkuhavce a 250  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{M}$  roztoku substrátu KSp35 v další mikrozkuhavce inkubovány v třepacím bločku Thermomixer (Eppendorf) při 37 °C a 1000 RPM po dobu 60 minut.

Po inkubaci byly vzorky krátce centrifugovány na stolní centrifuze Eppendorf 5424 (Eppendorf) a následně bylo na předeřátou 96-jamkovou destičku (Greiner Bio-One) pipetováno 40  $\mu\text{l}$  z každé mikrozkuhavky s roztokem inhibitoru s rhomboidem GlpG. Dále bylo do dvou jamek pipetováno 40  $\mu\text{l}$  roztoku rhomboidu GlpG, sloužícího jako neinhibovaná reakce, a nakonec do dvou jamek 40  $\mu\text{l}$  1x Pufru s 10% (v/v) DMSO, sloužícího jako pozadí. K těmto množstvím bylo do každé jamky přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku fluorogenního substrátu KSp35. Destička byla vložena do přístroje TECAN infiniteM1000 (TECAN) a po dobu 40 minut byla měřena fluorescence v čase při excitaci 335 nm a emisi 493 nm. Fluorescence byla měřena na základě rozštěpení vazby mezi reportérem a zhášecem ve fluorogenním substrátu. Tím došlo k jejich vzájemnému oddálení, což mělo za následek přerušení rezonančního přenosu energie z reportéru na zhášec. Rychlost štěpení substrátu tedy bylo možné sledovat jako nárůst emise reportérem v čase.

### 3.2.12 Určování konstanty $\text{IC}_{50}$

Ze závislosti fluorescence na čase byly v programu GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) lineární regresí určeny počáteční rychlosti reakce pro jednotlivé koncentrace inhibitoru ( $v_i$ ) a počáteční rychlost neinhibované reakce ( $v_0$ ). Jejich podíl udávaný v procentech ( $(v_i/v_0) \times 100$ ), představující relativní reakční rychlost, byl vynesena proti koncentraci inhibitoru ( $[I]$ ) a závislost byla analyzována nelineární regresí podle tříparametrového modelu pro křivku koncentrace-odpověď („[Inhibitor] vs. response (three parameters)“) se standardním sklonem závislosti (Hillův koeficient -1), tedy

$(v_i/v_0) = B + (T-B) / (1+[I]/IC_{50})$ , kde B je limitní hodnota spodního plata a T je limitní hodnota horního plata sigmoidní závislosti.

### 3.2.13 Kompetiční experiment – inhibice štěpení reportérového substrátu KSp76 kompetujícím substrátem

#### Složení použitých roztoků:

2x Pufr bez DMSO: 40 mM HEPES pH 7,4; 300 mM NaCl; 0,1% (w/v) DDM

1x Pufr s 20% (v/v) DMSO: 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM; 20% (v/v) DMSO

1x Pufr bez DMSO: 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM

Při kompetičním experimentu byly jako kompetitory použity substráty KSp73 a KSp98. Všechny kompetiční reakce byly prováděny při 37 °C, za 0,3 μM koncentrace rhomboidu, 10 μM koncentrace reportérového substrátu KSp76 a různých koncentrací jednotlivých kompetujících substrátů, přičemž prostředí reakce bylo ve všech reakcích stejné, a sice 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) DDM; 8% (v/v) DMSO.

Roztok kompetujícího peptidu KSp73 o objemu 180 μl a koncentraci 2660 μM s 20% (v/v) DMSO byl připraven smísením komponent uvedených v Tab. 5 v mikrozkuhavce (hodnoty uvedené v Tab. 5 odpovídají přípravě roztoku peptidu KSp73, pro druhý kompetujícího peptid se hodnoty liší, neboť se lišily koncentrace jeho zásobního roztoku). Následně bylo z roztoku připraveno ředící řadou (1,5x) 16 mikrozkuhovek o objemu 50 μl, kdy pro ředění byl použit 1x Pufr s 20% (v/v) DMSO. Z každé mikrozkuhavky bylo do 16-ti nových mikrozkuhovek odpipetováno 25 μl tohoto roztoku a ke zbylému množství v každé mikrozkuhavce bylo přidáno 25 μl 1x Pufru bez DMSO.

*Tab. 5: Komponenty pro přípravu roztoku peptidu KSp73.*

2x Pufr bez DMSO [μl]	Voda [μl]	DMSO [μl]	Peptid KSp73 o koncentraci 13,3 mM [μl]
90,0	54,0	0,0	36,0

Roztok rhomboidu o objemu 860 μl a koncentraci 0,8 μM byl připraven přidáním 780 μl 1x Pufru bez DMSO k alikvotu rhomboidu GlpG o objemu 80 μl a koncentraci



8,6  $\mu\text{M}$  (viz kapitola 3.2.10) v mikrozkuhavce na ledu. Tento roztok byl opatrně promíchán špičkou a do každé mikrozkuhavky s roztokem kompetujícího peptidu bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku a dalších 90  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku bylo odpipetováno do nové mikrozkuhavky k němuž bylo přidáno 90  $\mu\text{l}$  1x Pufru s 20% (v/v) DMSO.

Všechny mikrozkuhavky se vzorky byly krátce centrifugovány na stolní centrifuze Eppendorf 5424 (Eppendorf) a poté spolu s 350  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{M}$  roztoku substrátu KSp76 v další mikrozkuhavce inkubovány v třepacím bločku Thermomixer (Eppendorf) při 37 °C a 1000 RPM po dobu 60 minut.

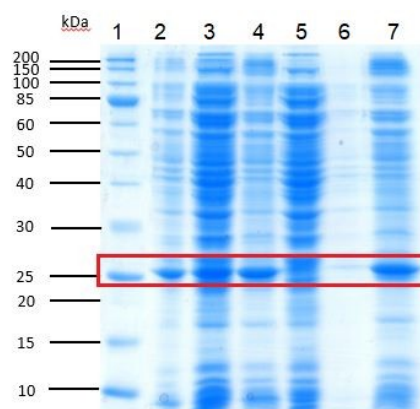
Po inkubaci byly vzorky krátce centrifugovány na stolní centrifuze Eppendorf 5424 (Eppendorf) a následně bylo na předeřátou 96-jamkovou destičku (Greiner Bio-One) pipetováno 40  $\mu\text{l}$  z každé mikrozkuhavky s roztokem kompetujícího peptidu s rhomboidem GlpG. Dále bylo do tří jamek pipetováno 40  $\mu\text{l}$  roztoku rhomboidu GlpG, sloužícího jako neinhibovaná reakce, a nakonec do 16-ti jamek 40  $\mu\text{l}$  z každé mikrozkuhavky s roztokem kompetujícího peptidu s 1x Pufrem bez DMSO, které sloužilo jako pozadí. K těmto množstvím bylo do každé jamky přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku fluorogenního reportérového substrátu KSp76. Destička byla vložena do přístroje TECAN infiniteM1000 (TECAN) a po dobu 40 minut byla měřena fluorescence v čase při excitaci 553 nm a emisi 583 nm.

Relativní reakční rychlosti byly vyneseny proti koncentraci kompetujícího substrátu obdobně jako v kapitole 3.2.12.

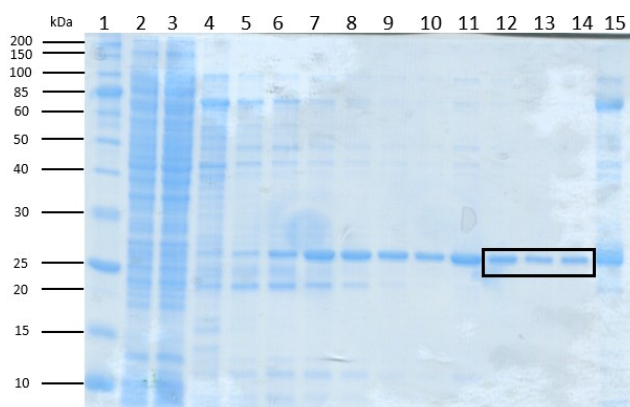
## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Exprese a purifikace rhomboidu GlpG

Prvním cílem práce bylo exprimovat a purifikovat rhomboid GlpG. Gen kódující *E. coli* rhomboid GlpG, umístěný ve vektoru pET25b+, byl transformován do chemicky kompetentních buněk *E. coli* C41(DE3). Správnost transformace potvrdil nárůst buněk na plotně s AMP. Exprese byla indukována přidáním IPTG. Po homogenizaci buněk a následné centrifugaci lyzátu, vedoucí k odstranění zbytků buněk, je zřejmé, že se menší část požadovaného proteinu nacházela v nerozpustném podílu (pravděpodobně inkluzních těliscích) a větší část v buněčných membránách (Obr. 13 – dráha 2 a 3, str. 43). Téměř všechnen GlpG, spolu s dalšími membránovými proteiny, se podařilo získat v peletě ultracentrifugací supernatantu z předchozího kroku (Obr. 13 – dráha 4 a 5, str. 43). Solubilizací pelety v 1,5% (w/v) detergentu DDM a následné ultracentrifugací došlo k oddělení nesolubilizovaných proteinů a precipitátů v peletě od supernatantu obsahujícího solubilizované proteiny, včetně veškerého GlpG (Obr. 13 – dráha 6 a 7, str. 43). Ze směsi solubilizovaných proteinů byl rhomboid GlpG, obsahující histidinovou kotvu, získán afinitní chromatografií na imobilizovaných kobaltnatých iontech na nosiči TALON<sup>TM</sup>. Průběh a účinnost chromatografie byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 14, str. 43). Z výsledku analýzy je zjevné, že vhodné čisté eluční frakce pro další zpracování byly tři poslední (vzorky EL2II, EL2III, EL2IV), které byly následně odsoleny a zahuštěny na koncentraci 0,9 mg/ml. Rhomboid GlpG, potřebný pro následné experimenty, se podařilo získat v celkovém množství 3,8 mg z 8 litrů kultury. Podobný výtěžek je v laboratoři školitele typicky dosahován.



**Obr. 13: SDS-PAGE analýza izolace celodélkového rhomboidu GlpG.** **Dráha 1:** 5  $\mu$ l standardu (Protein Ladder marker 10–200 kDa), **Dráha 2:** 10  $\mu$ l vzorku pelety po nízkootáčkové centrifugaci buněčného lyzátu, **Dráha 3:** 10  $\mu$ l vzorku supernatantu po nízkootáčkové centrifugaci buněčného lyzátu, **Dráha 4:** 10  $\mu$ l vzorku pelety po ultracentrifugaci supernatantu, **Dráha 5:** 10  $\mu$ l vzorku supernatantu po ultracentrifugaci supernatantu, **Dráha 6:** 10  $\mu$ l vzorku pelety po ultracentrifugaci pelety solubilizované v 1,5% (w/v) detergentu DDM, **Dráha 7:** 10  $\mu$ l vzorku supernatantu po ultracentrifugaci pelety solubilizované v 1,5% (w/v) detergentu DDM.

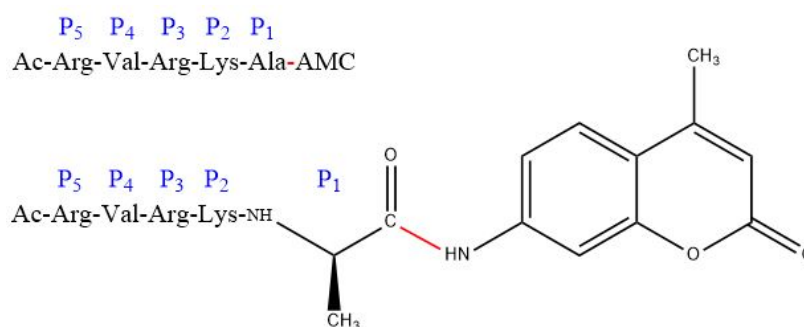


**Obr. 14: SDS-PAGE analýza afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech.** **Dráha 1:** 5  $\mu$ l standardu (Protein Ladder marker 10–200 kDa), **Dráha 2:** 10  $\mu$ l vzorku F1, **Dráha 3:** 10  $\mu$ l vzorku F2, **Dráha 4:** 10  $\mu$ l vzorku C pufr, **Dráha 5:** 10  $\mu$ l vzorku W1, **Dráha 6:** 10  $\mu$ l vzorku W2, **Dráha 7:** 10  $\mu$ l vzorku EL1I, **Dráha 8:** 10  $\mu$ l vzorku EL1II, **Dráha 9:** 10  $\mu$ l vzorku EL1III, **Dráha 10:** 10  $\mu$ l vzorku EL1IV, **Dráha 11:** 10  $\mu$ l vzorku EL2I, **Dráha 12:** 10  $\mu$ l vzorku EL2II, **Dráha 13:** 10  $\mu$ l vzorku EL2III, **Dráha 14:** 10  $\mu$ l vzorku EL2IV, **Dráha 15:** 10  $\mu$ l vzorku nosiče. Vhodné čisté eluční frakce (dráha 12–14), které byly dále zpracovávány, jsou vyznačeny v rámečku.

## 4.2 Charakterizace vlivu záměn v P1 pozici substrátů na jejich účinnost štěpení rhomboidem GlpG

Cílem této analýzy bylo na základě změn postranního řetězce v P1 pozici substrátů prozkoumat kapacitní a interakční možnosti kontinuální dutiny v GlpG, která je tvořena S1 podmístem a navazujícím „místem zadržujícím vodu“ [53]. Experimentálně se jednalo

o srovnání vlivu záměn v P1 pozici substrátů na rychlost jejich štěpení připraveným rhomboidem GlpG. K tomuto účelu bylo v laboratoři školitele (Dr. Stanchev) připraveno 10 fluorogenních substrátů odvozených od „mateřského“ pentapeptidového substrátu Ac-RVRKA-amc, kde amc je 7-amino-4-methylkumarin. Sekvence substrátu byla navržena na základě preferencí, které GlpG vykazuje pro aminokyseliny v P1–P5 pozicích, tedy RVRKA [49, 50]. I když tento substrát neobsahuje transmembránovou doménu, GlpG je schopen jej štěpit. Afinita tohoto substrátu je ale zřejmě velmi nízká, jelikož je nutné jej pro dosažení dostatečné fluorescenční odezvy používat v poměrně vysokých koncentracích (stovky  $\mu\text{M}$ ). Substráty se lišily pouze aminokyselinou v P1 pozici. U „mateřského“ substrátu je P1 pozice obsazena alaninem a jednotlivé substráty v této pozici měly různé deriváty alaninu, které měly substituovaný lineární postranní řetězec tak, aby jeho konec umožňoval vodíkové vazby v distální části dutiny S1 podmísta, tj. ve „vodu zadržujícím místě“. Zavedení atomu fluoru na terminální skupinu postranního řetězce má tu logiku, že fluor je jednak poměrně dobře tolerován v hydrofobním prostředí, díky své polaritě je ale také schopen vodíkových vazeb a polárních interakcí. Takže by mohl být schopen využívat interakcí S1 podmísta lépe než „obyčejný“ uhlovodíkový zbytek. Náhled na strukturu a sekvenci substrátů poskytuje Obr. 15 a jejich přehled je zobrazen v Tab. 6 (str. 46).



**Obr. 15: Struktura a sekvence substrátu KSp86, který obsahuje v P1 pozici alanin.** Tento substrát bude dále sloužit jako ukázkový model. Amidová vazba štěpená rhomboidem GlpG je zobrazena červeně.

Jako srovnávací parametr jednotlivých substrátů mezi sebou byla zvolena konstanta  $k_{\text{cat}}/K_M$ . Ideální by bylo porovnávání substrátů pomocí samostatných konstant  $k_{\text{cat}}$  a  $K_M$ . Ty ale v tomto případě nebylo možné stanovit samostatně kvůli příliš vysokému  $K_M$  „mateřského“ substrátu, které je větší než 500  $\mu\text{M}$  (předchozí měření v laboratoři školitele ukázala, že závislost  $v_0$  na  $[S]$  je lineární až do 500  $\mu\text{M}$ , Mgr. Tichá). Při měření ale lze

snadno splnit podmínku  $[S] \ll K_M$ . Pro kinetickou rovnici Michaelise a Mentenové, která má obvykle formu:

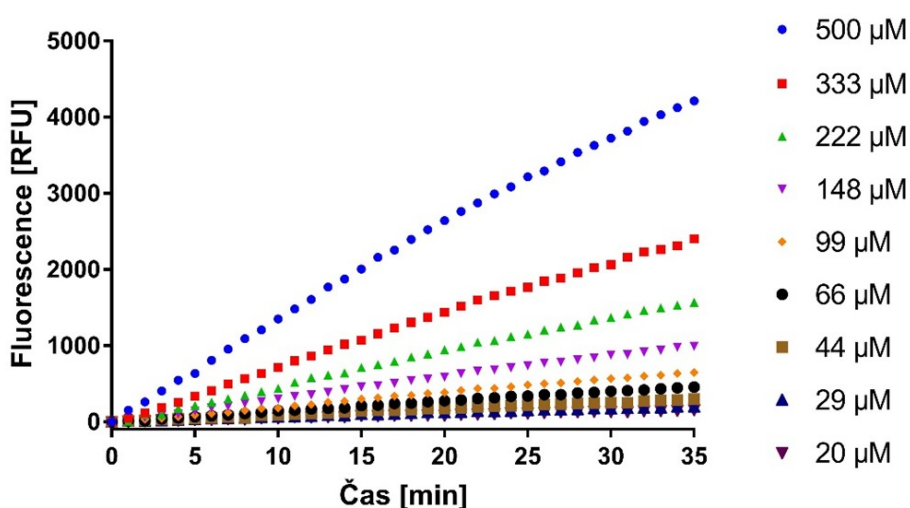
$$v = \frac{[E]_0[S]k_{\text{cat}}}{K_M + [S]}, \text{ kde } k_{\text{cat}}[E]_0 = V_{\text{max}}$$

za podmínky  $[S] \ll K_M$  platí:

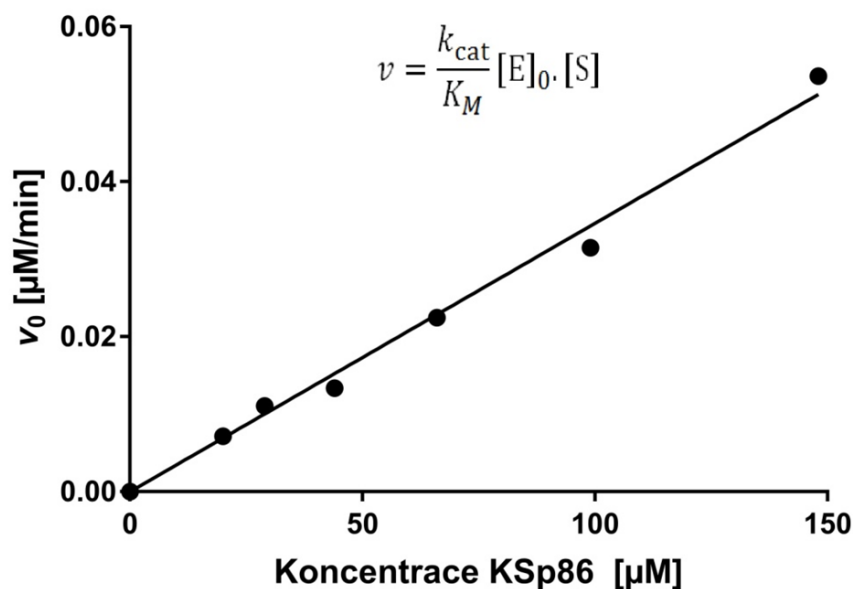
$$v = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} [E]_0 [S]$$

Z tohoto tvaru rovnice je patrné, že konstanta  $k_{\text{cat}}/K_M$  odpovídá hodnotě směrnice závislosti počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu dělené celkovou koncentrací enzymu ( $[E]_0$ ) a lze ji zde pro porovnávání použít [66].

Každý z deseti substrátů z Tab. 6 (str. 46) byl štěpen rhomboidem GlpG o koncentraci 0,4  $\mu\text{M}$ , typicky v triplikátu. Měření probíhalo při 37 °C po dobu 35 minut v přístroji TECAN infiniteM1000, kdy byla odečítána fluorescence v čase. Ze závislosti fluorescence na čase (Obr. 16) byly určeny počáteční rychlosti pro jednotlivé koncentrace substrátu. Hodnota konstanty  $k_{\text{cat}}/K_M$ , potřebná pro srovnání testovaných substrátů, přitom odpovídala velikosti směrnice lineárního úseku závislosti počátečních rychlostí na koncentracích substrátu dělené celkovou koncentrací enzymu ( $[E]_0$ ) (Obr. 17, str. 46). Hodnoty  $k_{\text{cat}}/K_M$  byly pro každý substrát zprůměrovány ze tří měření (Tab. 6, str. 46) a na základě těchto výsledků byly substráty porovnány (Obr. 18, str. 47).



Obr. 16: Závislost fluorescence na čase při štěpení fluorogenního substrátu KSp86 rhomboidem GlpG.



**Obr. 17:** Určování konstanty  $k_{\text{cat}}/K_M$  pro štěpení fluorogenního substrátu KSp86 rhomboidem GlpG. Hodnota konstanty odpovídá směrnici závislosti počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu dělené celkovou koncentrací enzymu  $[E]_0$ .

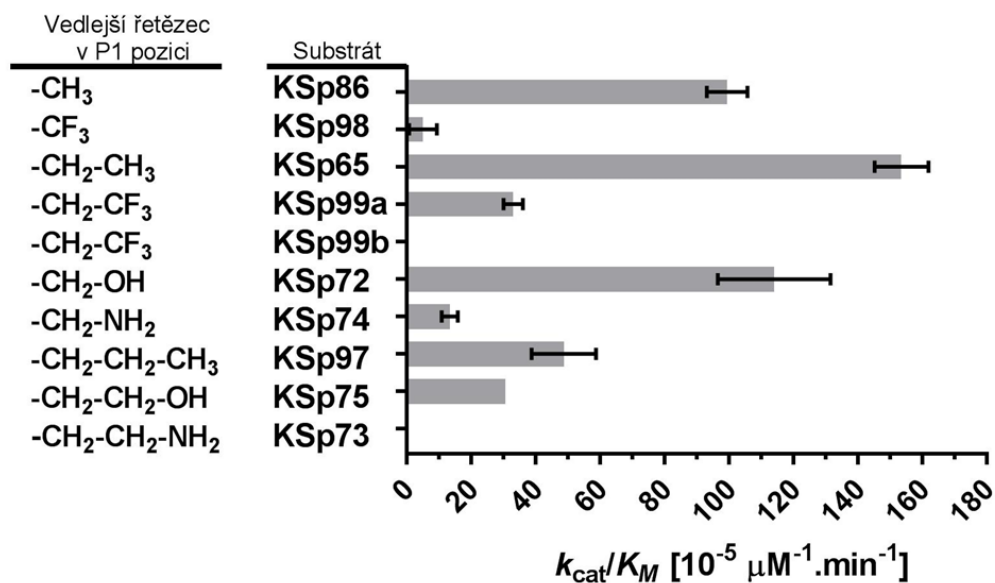
**Tab. 6:** Výsledné hodnoty průměrů konstant  $k_{\text{cat}}/K_M$  testovaných fluorogenních substrátů. Pro každý substrát bylo provedeno  $n$  nezávislých měření a průměrné hodnoty jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou (SD).

Substrát	P1 pozice***	Postranní řetězec	$k_{\text{cat}}/K_M \pm \text{SD}$ [ $10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ]	n
KSp86*	alanin	-CH <sub>3</sub>	99,4 ± 6,3	3
KSp98*	trifluoroalanin	-CF <sub>3</sub>	5,0 ± 4,3	2
KSp65*	2-aminobutanová kyselina	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	153,6 ± 8,3	3
KSp99a (L-isomer)	trifluoromethylalanin	-CH <sub>2</sub> -CF <sub>3</sub>	33,0 ± 3,0	4
KSp99b (D-isomer)	trifluoromethylalanin	-CH <sub>2</sub> -CF <sub>3</sub>	nebyl štěpen	-
KSp72*	serin	-CH <sub>2</sub> -OH	114 ± 18	5
KSp74*	2,4-diaminopropanová kyselina	-CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	13,3 ± 2,5	3
KSp97*	norvalin	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	49 ± 10	3
KSp75*	homoserin	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	30,5 **	1
KSp73*	2,4-diaminobutanová kyselina	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	nebyl štěpen	-

\*Substrát je směs enantiomerů L a D v pozici P2.

\*\*Substrát KSp75 byl měřen pouze jednou kvůli jeho omezené dostupnosti vlivem nízkého výtěžku syntézy.

\*\*\*Všechny aminokyseliny v P1 pozici byly L-enantiomery.



**Obr. 18:** Porovnání testovaných fluorogenních substrátů na základě získaných hodnot průměrů konstant  $k_{cat}/K_M$  z více měření. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky (SD). Hodnota konstanty  $k_{cat}/K_M$  u substrátu KSp75 není zobrazena s odchylkou, neboť byl měřen pouze jednou kvůli jeho omezené dostupnosti vlivem nízkého výtěžku syntézy.

Z tabulky a grafu je patrné, že nejlépe štěpeným substrátem byl KSp65 (P1: -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). Hned za ním dosahovaly přibližně stejných hodnot  $k_{cat}/K_M$  substráty KSp72 (P1: -CH<sub>2</sub>-OH) a „mateřský“ KSp86 (P1: -CH<sub>3</sub>). Následovaly substráty KSp97 (P1: -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), KSp99a (P1: -CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub> L-isomer) a KSp75 (P1: -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH). Špatně štěpený byl substrát KSp74 (P1: -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) a ještě horší hodnoty dosahoval substrát KSp98 (P1: -CF<sub>3</sub>). Substráty KSp99b (P1: -CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub> D-isomer) a KSp73 (P1: -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) nebyly štěpeny vůbec.

Zdá se tedy, že GlpG obecně preferuje v P1 pozici aminokyseliny s lineárními postranními řetězci o počtu skupin 1–2. Z hlediska prostorového uspořádání je u substrátu KSp99 (P1: -CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>) lépe štěpen jeho L-enantiomer (KSp99a). Koncové skupiny -CH<sub>3</sub> a -OH se zdají být tolerovány přibližně stejně dobře, zatímco koncové skupiny -NH<sub>2</sub> a -CF<sub>3</sub> nikoliv, možná proto, že jsou již příliš veliké nebo v prvním případě kladně nabitě.

Výsledky tedy potvrzují předpokládanou schopnost dutiny tvořené S1 podmístem a „místem zadržujícím vodu“ [54] pojmout větší aminokyselinové zbytky, než preferovaný alanin v P1 pozici, jak bylo dříve zjištěno [50]. Vzhledem k hydrofobnímu charakteru S1 podmísta zmiňovanému v [54] není nijak překvapující, že nejvíce preferovány jsou nenabitě lineárních postranní řetězce – substráty KSp65 (P1: -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) a KSp86 (P1: -CH<sub>3</sub>). Zjištěná skutečnost, že substrát KSp65 (P1: -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) má lepší kinetické

vlastnosti než „mateřský“ substrát KSp86 (P1:  $-\text{CH}_3$ ), byla objevena jen díky možnosti zabudovávat nepřirozené aminokyseliny do syntetických peptidových substrátů. Předchozí analýza specifity GlpG využívala proteinových substrátů vzniklých biogenní cestou [50], a ukázala silnou preferenci pro alanin v P1 pozici (což v mém případě odpovídá „mateřskému substrátu“). Důvodem je pravděpodobně lepší využití vazby substrátu KSp65 (P1:  $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ) do dutiny S1 podmísta a tato modifikace na 2-aminobutanovou kyselinu v P1 pozici byla tudíž využita pro návrh ketoamidových inhibitorů (STS898a a STS1002).

Překvapivá je i poměrně vysoká hodnota  $k_{\text{cat}}/K_M$  substrátu KSp72 (P1:  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ) v porovnání s výše zmíněným experimentem v článku [50], kde testovaný substrát obsahující v P1 pozici aminokyselinu serin byl velmi špatně štěpen. Možným vysvětlením je jiný sekvenční kontext (TatA substrát v [50], ale LacYTM2 v této práci) a potenciální interní interakce uvnitř substrátu vedoucí k nežádoucím strukturním omezením spojeným se serinem v P1 pozici. Obecně je však tento výsledek v souladu s vlastností dutiny, která je ve své distální části, tzv. „místě zadržujícím vodu“, polární, právě jako samotné aminokyseliny serin (KSp72) a homoserin (KSp75) v P1 pozicích.

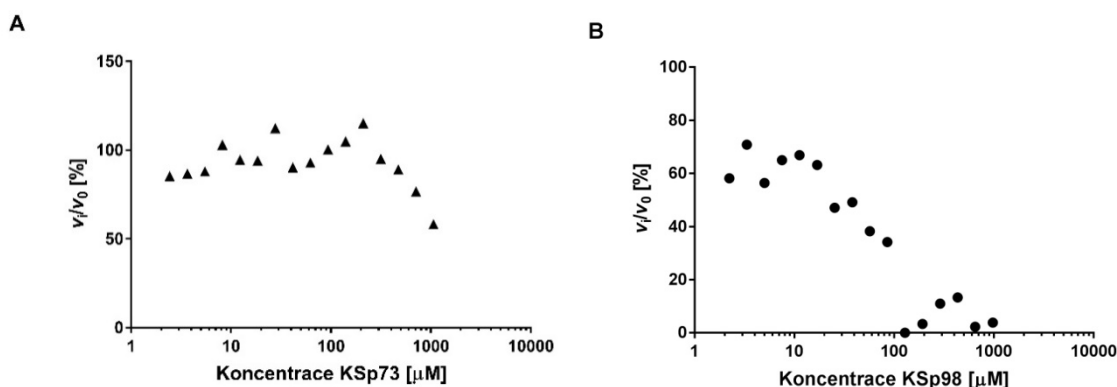
Nízké nebo žádné štěpení substrátů obsahujících v P1 pozicích kladně nabitou koncovou skupinu  $-\text{NH}_2$  (KSp74 P1:  $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$  a KSp73 P1:  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ) je mírně překvapivé, ale může být způsobeno částečným kladným nábojem povrchu distální části S1 podmísta a případně vysokou energetickou bariérou, kterou je nutné překonat pro průnik hydrofobní proximální části dutiny S1 podmísta.

Absence štěpení substrátu KSp73 (P1:  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ) a velmi špatné štěpení substrátu KSp98 (P1:  $-\text{CF}_3$ ) může mít v principu dva důvody. Buď se dané substráty na GlpG vůbec neváží (mají velmi vysoké  $K_M$ ), anebo se váží, ale nemohou být přeměněny (čili mají velmi nízké  $k_{\text{cat}}$ ). Druhá zmiňovaná možnost by nastala například tehdy, pokud by navázaný substrát v S1 podmístě a „místě zadržujícím vodu“ interferoval s transferem molekul vody nutné k deacylaci a dokončení katalytického cyklu GlpG. Pokud by se tedy jednalo o tuto druhou možnost, měly by tyto substráty být schopny kompetovat s jinými, dobře přeměňovanými substráty a tím inhibovat jejich přeměnu.

Ve snaze lépe objasnit chování substrátů KSp73 a KSp98 byl proveden kompetiční experiment s transmembránovým reportérovým substrátem KSp76. Bylo tedy měřeno štěpení fluorogenního transmembránového substrátu KSp76 rhomboidem GlpG a jeho inhibice rostoucí koncentrací KSp73 či KSp98. KSp76 obsahující fluorofor TAMRA (ex. 553 / em. 583 nm) je řádově rychleji štěpen než KSp73 či KSp98 obsahující



aminomethylkumarin (ex. 355 nm / em. 450 nm). Absorpční a emisní maxima obou fluoroforů jsou úplně oddělena a tudíž rostoucí koncentrace KSp73 či KSp98 neinterferuje s fluorescencí KSp76. Měření probíhalo při 37 °C po dobu 40 minut v přístroji TECAN infiniteM1000, kdy byla odečítána fluorescence v čase. Ze závislosti fluorescence na čase byly určeny počáteční rychlosti pro jednotlivé koncentrace inhibitoru (v tomto případě substrátu KSp73 nebo KSp98) a počáteční rychlosti neinhibované reakce. Vynesením závislosti podílu jednotlivých počátečních rychlostí inhibitoru a neinhibované reakce na jednotlivých koncentracích inhibitoru byly získány body inhibiční křivky (Obr. 19). Získaná data mají předběžný charakter a kvůli nedostatku obou substrátů bohužel nebylo možné kompetiční experimenty zopakovat a proměřit podrobněji. Zdržela jsem se tudíž proložení závislosti nelineární regresí a určení hodnot konstanty  $IC_{50}$ . I tak tyto předběžné výsledky ukazují řádový rozdíl mezi chováním obou inhibitorů, a proto jsem je do práce zařadila.



**Obr. 19: Kompetiční experiment – inhibice štěpení reportérového substrátu KSp76 kompetujícím substrátem KSp73 (A) a KSp98 (B).** Z důvodu nízké kvality dat nelze spolehlivě určit konstantu  $IC_{50}$  a kvůli nedostatku materiálu nebylo možné experimenty zopakovat. Tato data nicméně ukazují řádový rozdíl v chování obou kompetujících substrátů a naznačují, že substrát KSp98 je na rozdíl od KSp73 schopen vazby do aktivního místa (S1 podmísta).

Se zvyšující se koncentrací kompetujícího substrátu KSp98 (P1:  $-CF_3$ ) pozorujeme proporcionální snížení reakční rychlosti až do úplné inhibice a odhadovaná hodnota  $IC_{50}$  by se nejspíše pohybovala okolo 50  $\mu M$ . Schopnost KSp98 inhibovat štěpení reportérového KSp76 znamená, že KSp98 interaguje s aktivním místem GlpG. Důvodem nízké hodnoty  $k_{cat}/K_M$  KSp98 by proto pravděpodobně mohla být právě velmi nízká hodnota konstanty  $k_{cat}$ . To by naznačovalo možnost, že u KSp98 je inhibována deacylace, kdy dochází k navázání substrátu, ovšem ne k jeho následnému uvolnění za tvorby

produktu, protože acyl-enzym není hydrolyzován. Důvodem by mohla být schopnost atomů fluoru tvořit vodíkové vazby a tím zamezovat účinnému transferu molekul vody ke katalytické dyádě.

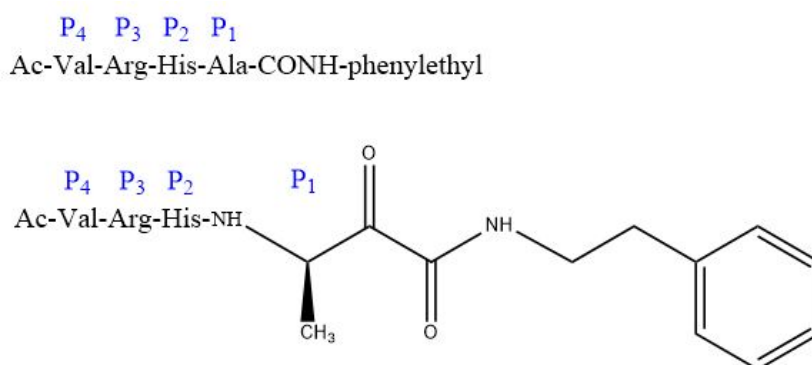
Se zvyšující se koncentrací kompetujícího substrátu KSp73 (P1:  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ) pozorujeme jen částečné snížení reakční rychlosti až v milimolární oblasti. V daném rozsahu koncentrací kompetujícího substrátu nepozorujeme úplnou inhibici štěpení reportérového substrátu (KSp76) a  $\text{IC}_{50}$  by se mohla pohybovat minimálně okolo 1–2 mM. Substrát KSp73 je tedy velmi špatným inhibitem, což svědčí o jeho nízké schopnosti interagovat s aktivním místem, která je nejspíše způsobena velkým zbytkem v P1 pozici. Příčinou velmi nízké hodnoty  $k_{\text{cat}}/K_M$  tohoto substrátu pro GlpG by pravděpodobně mohla být především velmi vysoká hodnota  $K_M$ .

V souhrnu tyto výsledky naznačují, že dlouhý substituent s kladně nabitou aminoskupinou v P1 pozici substrátu rhomboidu GlpG není tolerován a není schopen interagovat s S1 podmístem, zatímco deriváty alaninu s fluorovanou metylovou skupinou postranního řetězce v P1 pozici jsou schopny vazby do S1 podmísta a mohou interferovat s transferem vody pro deacylaci.

### **4.3 Vliv vybraných aminokyselin v P1 pozici peptidyl $\alpha$ -ketoamidů na jejich inhibiční vlastnosti**

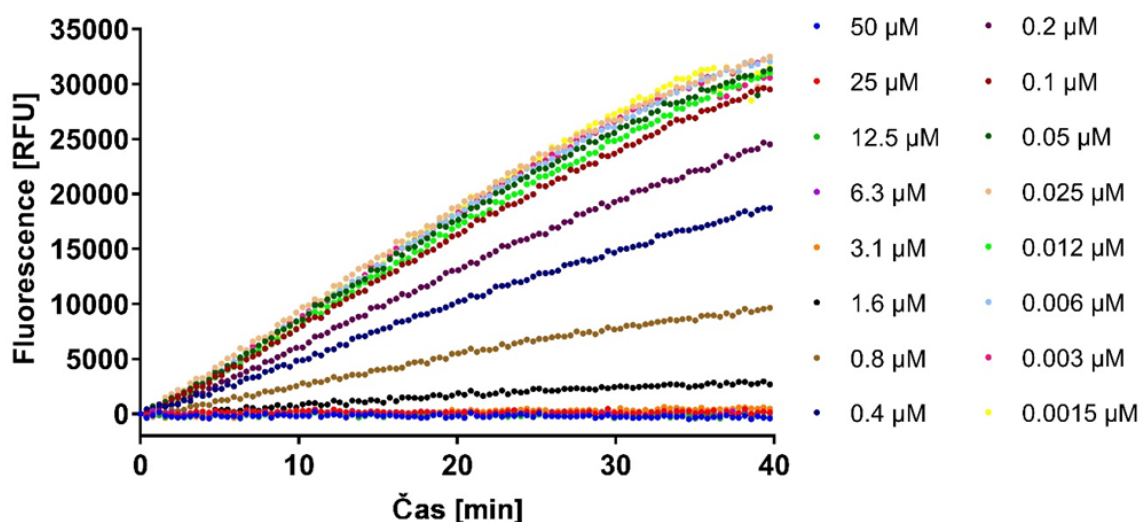
Inhibitory rhomboidů na bázi peptidyl ketoamidů jsou vázány na katalytický serin kovalentně a reverzibilně a mechanismus deacylace pro jejich aktivitu není příliš podstatný. Ovšem plné využití S1 podmísta a „místa zadržujícího vodu“ pro vazbu P1 aminokyseliny by afinitu inhibitorů k rhomboidu mohlo zlepšit. K tomu účelu byly vybrané aminokyseliny, identifikované v analýze uvedené výše, zabudovány do peptidyl ketoamidového inhibitoru GlpG. Jako „mateřský“ inhibitor byl použit ketoamidový inhibitor s preferovanou sekvencí VRHA a fenylethylovým substituentem na koncovém amidovém dusíku [49, 50] (Obr. 20, str. 51). Od tohoto skeletu bylo navrženo několik variant, které obsahovaly modifikované aminokyseliny (různě prodloužené deriváty alaninu) v P1 pozici. Jednak 2-aminobutanovou kyselinu, která v substrátech vykazovala nejvyšší hodnotu  $k_{\text{cat}}/K_M$  a pak deriváty s fluorovaným postranním řetězcem (trifluoroalanin a trifluoromethylalanin). Bohužel inhibitor s trifluoroalaninem v P1 pozici se nepodařilo připravit. Byly tedy otestovány následující inhibitory (připraveny

v laboratoři školitele, Dr. Stanchev). Náhled na strukturu a sekvenci inhibitorů poskytuje Obr. 20 a jejich přehled je zobrazen v Tab. 7 (str. 52).



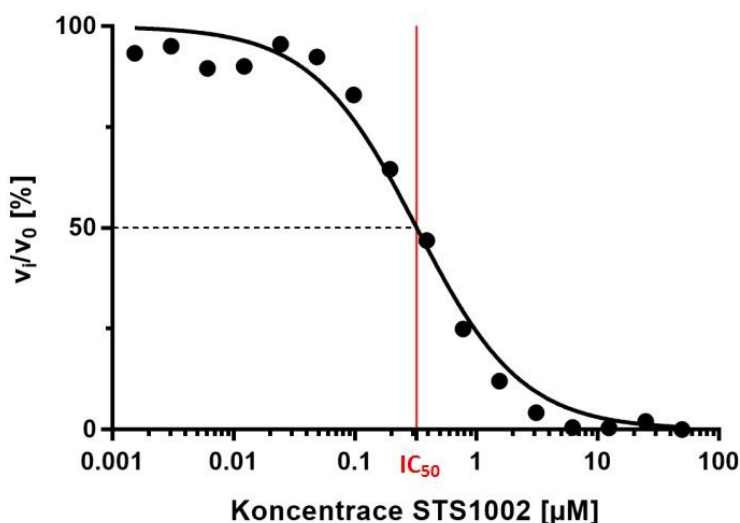
**Obr. 20: Struktura a sekvence inhibitoru STS1002, který obsahuje v P1 pozici alanin. Tento inhibitor bude dále sloužit jako ukázkový model.**

S každým ze čtyř syntetizovaných inhibitorů byla změřena inhibice štěpení fluorogenního transmembránového substrátu KSp35 rhomboidem GlpG v triplikátech. Měření probíhalo při 37 °C po dobu 40 minut v přístroji TECAN infiniteM1000, kdy byla odečítána fluorescence v čase. Ze závislosti fluorescence na čase (Obr. 21) byly určeny počáteční rychlosti pro jednotlivé koncentrace inhibitoru a počáteční rychlost neinhibované reakce.



**Obr. 21: Závislost fluorescence na čase pro inhibitor STS1002 při štěpení fluorogenního transmembránového substrátu KSp35 rhomboidem GlpG.**

Hodnota konstanty  $IC_{50}$  byla získána vynesáním závislosti podílu jednotlivých počátečních rychlostí inhibované a neinhibované reakce (= relativní rychlost reakce) na jednotlivých koncentracích inhibitoru a následným proložením této závislosti nelineární regresí (Obr. 22).



**Obr. 22:** Inhibiční křivka inhibitoru STS1002 při štěpení fluorogenního transmembránového substrátu KSp35 rhomboidem GlpG, ze které byla určena konstanta  $IC_{50}$ . Výsledek nelineární regrese závislosti relativních reakčních rychlostí na koncentraci inhibitoru je proložen křivkou. Hodnota konstanty  $IC_{50}$  odpovídá koncentraci inhibitoru způsobující 50% inhibici enzymu [58] (vyznačeno horizontální přerušovanou čarou) a je vyznačena červenou svislou čarou. Obdobně byla analyzována inhibice ostatními inhibitory.

Hodnoty konstant  $IC_{50}$  ze tří měření byly zprůměrovány pro každý inhibitor (Tab. 7) a na základě získaných hodnot byly mezi sebou porovnávány.

**Tab. 7:** Porovnání účinnosti peptidyl ketoamidových inhibitorů se záměnami aminokyseliny v P1 pozici. Konstanty poloviční inhibice ( $IC_{50}$ ) byly určeny na základě nelineární regrese dat z experimentů analogických tomu zobrazenému na obr. 22. Pro každý inhibitor byla provedena tři nezávislá měření ( $n=3$ ) a průměrné hodnoty jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou (SD).

Inhibitor	P1 pozice**	Postranní řetězec	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu M$ ]
STS1002*	alanin	-CH <sub>3</sub>	$0,38 \pm 0,04$
STS898a*	2-aminobutanová kyselina	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	$0,28 \pm 0,05$
STS972a (L-isomer)	trifluoromethylalanin	-CH <sub>2</sub> -CF <sub>3</sub>	$14,5 \pm 1,5$
STS972b (D-isomer)	trifluoromethylalanin	-CH <sub>2</sub> -CF <sub>3</sub>	$92 \pm 21$

\*Inhibitor je směs enantiomerů L a D v P2 pozici.

\*\*Všechny aminokyseliny v P1 pozici byly L-enantiomery.

Z výsledků je patrné, že nejlepším inhibitorem byl STS898a (P1:  $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ). Hned za ním dosahoval nejnižší hodnoty  $\text{IC}_{50}$  inhibitor STS1002 (P1:  $-\text{CH}_3$ ). Špatným inhibitorem byl STS972a (P1:  $-\text{CH}_2\text{-CF}_3$  L-isomer) a nejvyšší hodnoty konstanty  $\text{IC}_{50}$  dosahoval inhibitor STS972b (P1:  $-\text{CH}_2\text{-CF}_3$  D-isomer).

Získané výsledky z analýzy substrátů a inhibitorů ukázaly, že L-2-aminobutanová kyselina je pro GlpG v P1 pozici lepší než L-alanin. Na úrovni  $\text{IC}_{50}$  je mezi nimi rozdíl asi 25 %, což se může zdát na první pohled málo, ale jelikož hodnoty  $\text{IC}_{50}$  se blíží polovině koncentrace enzymu v reakci ( $0,15\text{ }\mu\text{M}$ ), je v této situaci obtížné rozlišit mezi sebou velmi dobré inhibitory. Pro přesnější srovnání by bylo potřeba změřit přímo inhibiční konstantu  $K_i$  [64]. Z ostatních použitých modifikací v P1 pozici je vidět, že terminální trifluoromethyl je pravděpodobně již příliš velký ( $-\text{CH}_2\text{-CF}_3$ ) nebo inhibitory jej obsahující v P1 pozici ( $-\text{CF}_3$ ) nelze připravit. To však nevylučuje, že zavedení 1–2 atomů fluoru do terminálního methylu postranního řetězce alaninu či 2-aminobutanové kyseliny by mohlo splnit jak sterické, tak elektrostatické požadavky dutiny S1 podměsta a určitě má smysl tyto modifikace dále prozkoumat.

## 5 Závěr

- V této bakalářské práci byla vypracována rešerše o intramembránových proteasách, rhomboidu GlpG a inhibitech rhomboidů.
- Úspěšně byl exprimován a purifikován rhomboid GlpG.
- Analýzou štěpení substrátů, které se lišily zbytky v P1 pozicích, rhomboidem GlpG byly prozkoumány kapacitní a interakční možnosti dutiny S1 podmísta GlpG.
- GlpG obecně preferuje v P1 pozici aminokyseliny s lineárními postranními řetězci o počtu skupin 1-2. Koncové skupiny  $-\text{CH}_3$  a  $-\text{OH}$  se zdají být tolerovány přibližně stejně dobře, zatímco koncové skupiny  $-\text{CF}_3$  a  $-\text{NH}_2$  nikoliv, možná proto, že jsou již příliš veliké nebo ve druhém případě kladně nabitě.
- U peptidyl ketoamidových inhibitorů jsou v P1 pozici nejlépe akceptované postranní řetězce  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$  a  $-\text{CH}_3$  a pro další analýzu by bylo vhodné testovat jejich deriváty mono- nebo difluorované na terminální  $-\text{CH}_3$  skupině aminokyseliny v P1 pozici (např.  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{F}$ ).

## 6 Seznam použité literatury

1. Urban, S., Freeman, M.: Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Curr Opin Genet Dev* 12, 512-518 (2002)
2. Urban, S.: Making the cut: central roles of intramembrane proteolysis in pathogenic microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 7, 411-423 (2009)
3. Manolaridis, I., Kulkarni, K., Dodd, R. B., Ogasawara, S., Zhang, Z., Bineva, G., Reilly, N. O., Hanrahan, S. J., Thompson, A. J., Cronin, N., Iwata, S., Barford, D.: Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1. *Nature* 504, 301-305 (2013)
4. Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., Goldstein, J. L.: Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-398 (2000)
5. Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S., Goldstein, J. L.: Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell* 1, 47-57 (1997)
6. Urban, S., Lee, J. R., Freeman, M.: Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* 107, 173-182 (2001)
7. Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M. K., Ashman, K., Martoglio, B.: Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* 296, 2215-2218 (2002)
8. Meissner, C., Lorenz, H., Hehn, B., Lemberg, M. K.: Intramembrane protease PARL defines a negative regulator of PINK1- and PARK2/Parkin-dependent mitophagy. *Autophagy* 11, 1484-1498 (2015)
9. Whitworth, A. J., Lee, J. R., Ho, V. M., Flick, R., Chowdhury, R., McQuibban, G. A.: Rhomboid-7 and HtrA2/Omi act in a common pathway with the Parkinson's disease factors Pink1 and Parkin. *Dis Model Mech* 1, 168-174 (2008)
10. De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., Van Leuven, F.: Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387-390 (1998)
11. Blaydon, D. C., Etheridge, S. L., Risk, J. M., Hennies, H. C., Gay, L. J., Carroll, R., Plagnol, V., McDonald, F. E., Stevens, H. P., Spurr, N. K., Bishop, D. T., Ellis, A., Jankowski, J., Field, J. K., Leigh, I. M., South, A. P., Kelsell, D. P.: RHBDF2 mutations are associated with tylosis, a familial esophageal cancer syndrome. *Am J Hum Genet* 90, 340-346 (2012)
12. Civitarese, A. E., MacLean, P. S., Carling, S., Kerr-Bayles, L., McMillan, R. P., Pierce, A., Becker, T. C., Moro, C., Finlayson, J., Lefort, N., Newgard, C. B., Mandarino, L., Cefalu, W., Walder, K., Collier, G. R., Hulver, M. W., Smith, S. R., Ravussin, E.: Regulation of skeletal muscle oxidative capacity and insulin signaling by the mitochondrial rhomboid protease PARL. *Cell Metab* 11, 412-426 (2010)
13. Urban, S.: Mechanisms and cellular functions of intramembrane proteases. *Biochim Biophys Acta* 1828, 2797-2800 (2013)

14. Kinch, L. N., Ginalski, K., Grishin, N. V.: Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis: sequence homologs suggest an ancient signaling cascade. *Protein Sci* 15, 84-93 (2006)
15. Kanehara, K., Ito, K., Akiyama, Y.: YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA. *Genes Dev* 16, 2147-2155 (2002)
16. Schneider, J. S., Glickman, M. S.: Function of site-2 proteases in bacteria and bacterial pathogens. *Biochim Biophys Acta* 1828, 2808-2814 (2013)
17. Yu, Y. T., Kroos, L.: Evidence that SpoIVFB is a novel type of membrane metalloprotease governing intercompartmental communication during *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol* 182, 3305-3309 (2000)
18. Rudner, D. Z., Fawcett, P., Losick, R.: A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14765-14770 (1999)
19. Saito, A., Hizukuri, Y., Matsuo, E., Chiba, S., Mori, H., Nishimura, O., Ito, K., Akiyama, Y.: Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13740-13745 (2011)
20. Oeffner, F., Fischer, G., Happle, R., Konig, A., Betz, R. C., Bornholdt, D., Neidel, U., Boente Mdel, C., Redler, S., Romero-Gomez, J., Salhi, A., Vera-Casano, A., Weirich, C., Grzeschik, K. H.: IFAP syndrome is caused by deficiency in MBTPS2, an intramembrane zinc metalloprotease essential for cholesterol homeostasis and ER stress response. *Am J Hum Genet* 84, 459-467 (2009)
21. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J.: Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776 (1999)
22. King, A., Allan, D. S., Bowen, M., Powis, S. J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S. E., McMichael, A. J., Loke, Y. W., Braud, V. M.: HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* 30, 1623-1631 (2000)
23. Mayer, U., Nusslein-Volhard, C.: A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 2, 1496-1511 (1988)
24. Cohen, S., Carpenter, G., King, L., Jr.: Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 255, 4834-4842 (1980)
25. Freeman, M.: The rhomboid-like superfamily: molecular mechanisms and biological roles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 235-254 (2014)
26. Koonin, E. V., Makarova, K. S., Rogozin, I. B., Davidovic, L., Letellier, M. C., Pellegrini, L.: The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol* 4, 19 (2003)
27. Lemberg, M. K., Freeman, M.: Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases. *Genome Res* 17, 1634-1646 (2007)



28. Hedstrom, L.: Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 102, 4501-4524 (2002)
29. Vinothkumar, K. R., Stříšovský, K., Andreeva, A., Christova, Y., Verhelst, S., Freeman, M.: The structural basis for catalysis and substrate specificity of a rhomboid protease. *EMBO J* 29, 3797-3809 (2010)
30. Freeman, M.: Rhomboid proteases and their biological functions. *Annu Rev Genet* 42, 191-210 (2008)
31. Lohi, O., Urban, S., Freeman, M.: Diverse substrate recognition mechanisms for rhomboids; thrombomodulin is cleaved by Mammalian rhomboids. *Curr Biol* 14, 236-241 (2004)
32. Adrain, C., Stříšovský, K., Zettl, M., Hu, L., Lemberg, M. K., Freeman, M.: Mammalian EGF receptor activation by the rhomboid protease RHBDL2. *EMBO Rep* 12, 421-427 (2011)
33. Fleig, L., Bergbold, N., Sahasrabudhe, P., Geiger, B., Kaltak, L., Lemberg, M. K.: Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins. *Mol Cell* 47, 558-569 (2012)
34. Song, W., Liu, W., Zhao, H., Li, S., Guan, X., Ying, J., Zhang, Y., Miao, F., Zhang, M., Ren, X., Li, X., Wu, F., Zhao, Y., Tian, Y., Wu, W., Fu, J., Liang, J., Wu, W., Liu, C., Yu, J., Zong, S., Miao, S., Zhang, X., Wang, L.: Rhomboid domain containing 1 promotes colorectal cancer growth through activation of the EGFR signalling pathway. *Nat Commun* 6, 8022 (2015)
35. Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C., Winklhofer, K. F.: Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J* 31, 3038-3062 (2012)
36. Knopf, R. R., Adam, Z.: Rhomboid proteases in plants - still in square one? *Physiol Plant* 145, 41-51 (2012)
37. Clemmer, K. M., Sturgill, G. M., Veenstra, A., Rather, P. N.: Functional characterization of Escherichia coli GlpG and additional rhomboid proteins using an aarA mutant of Providencia stuartii. *J Bacteriol* 188, 3415-3419 (2006)
38. Riestra, A. M., Gandhi, S., Sweredoski, M. J., Moradian, A., Hess, S., Urban, S., Johnson, P. J.: A Trichomonas vaginalis Rhomboid Protease and Its Substrate Modulate Parasite Attachment and Cytolysis of Host Cells. *PLoS Pathog* 11, 1005294 (2015)
39. Brossier, F., Starnes, G. L., Beatty, W. L., Sibley, L. D.: Microneme rhomboid protease TgROM1 is required for efficient intracellular growth of Toxoplasma gondii. *Eukaryot Cell* 7, 664-674 (2008)
40. Baker, R. P., Wijetilaka, R., Urban, S.: Two Plasmodium rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria. *PLoS Pathog* 2, 113 (2006)
41. Wang, Y., Zhang, Y., Ha, Y.: Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease. *Nature* 444, 179-180 (2006)
42. Wu, Z., Yan, N., Feng, L., Oberstein, A., Yan, H., Baker, R. P., Gu, L., Jeffrey, P. D., Urban, S., Shi, Y.: Structural analysis of a rhomboid family intramembrane protease

- reveals a gating mechanism for substrate entry. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1084-1091 (2006)
43. Stříšovský, K.: Structural and mechanistic principles of intramembrane proteolysis--lessons from rhomboids. *FEBS J* 280, 1579-1603 (2013)
  44. Stříšovský, K., Sharpe, H. J., Freeman, M.: Sequence-specific intramembrane proteolysis: identification of a recognition motif in rhomboid substrates. *Mol Cell* 36, 1048-1059 (2009)
  45. Dickey, S. W., Baker, R. P., Cho, S., Urban, S.: Proteolysis inside the membrane is a rate-governed reaction not driven by substrate affinity. *Cell* 155, 1270-1281 (2013)
  46. Cho, S., Dickey, S. W., Urban, S.: Crystal Structures and Inhibition Kinetics Reveal a Two-Stage Catalytic Mechanism with Drug Design Implications for Rhomboid Proteolysis. *Mol Cell* 61, 329-340 (2016)
  47. Schechter, I., Berger, A.: On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27, 157-162 (1967)
  48. Stříšovský, K.: Why cells need intramembrane proteases - a mechanistic perspective. *FEBS J* 283, 1837-1845 (2016)
  49. Tichá, A., Stanchev, S., Škerle, J., Began, J., Ingr, M., Švehlová, K., Polovinkin, L., Růžicka, M., Bednářová, L., Hadravová, R., Poláchová, E., Rampírová, P., Březinová, J., Kašička, V., Majer, P., Stříšovský, K.: Sensitive Versatile Fluorogenic Transmembrane Peptide Substrates for Rhomboid Intramembrane Proteases. *J Biol Chem* 292, 2703-2713 (2017)
  50. Zoll, S., Stanchev, S., Began, J., Škerle, J., Lepšík, M., Peclínová, L., Majer, P., Stříšovský, K.: Substrate binding and specificity of rhomboid intramembrane protease revealed by substrate-peptide complex structures. *EMBO J* 33, 2408-2421 (2014)
  51. McMurry, J.: *Organická chemie. VITIUM*, Brno (2007)
  52. Uritsky, N., Shokhen, M., Albeck, A.: The Catalytic Machinery of Rhomboid Proteases: Combined MD and QM Simulations. *J Chem Theory Comput* 8, 4663-4671 (2012)
  53. Stříšovský, K.: Rhomboid protease inhibitors: Emerging tools and future therapeutics. *Semin Cell Dev Biol* 60, 52-62 (2016)
  54. Zhou, Y., Moin, S. M., Urban, S., Zhang, Y.: An internal water-retention site in the rhomboid intramembrane protease GlpG ensures catalytic efficiency. *Structure* 20, 1255-1263 (2012)
  55. Powers, J. C., Kam, C. M., Narasimhan, L., Oleksyszyn, J., Hernandez, M. A., Ueda, T.: Mechanism-based isocoumarin inhibitors for serine proteases: use of active site structure and substrate specificity in inhibitor design. *J Cell Biochem* 39, 33-46 (1989)
  56. Xue, Y., Ha, Y.: Catalytic mechanism of rhomboid protease GlpG probed by 3,4-dichloroisocoumarin and diisopropyl fluorophosphonate. *J Biol Chem* 287, 3099-3107 (2012)
  57. Pierrat, O. A., Stříšovský, K., Christova, Y., Large, J., Ansell, K., Bouloc, N., Smiljanic, E., Freeman, M.: Monocyclic beta-lactams are selective, mechanism-based inhibitors of rhomboid intramembrane proteases. *ACS Chem Biol* 6, 325-335 (2011)

58. Copeland, R. A.: *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. Wiley Interscience, Hoboken, NJ (2005)
59. Wolf, E. V., Zeissler, A., Vosyka, O., Zeißler, E., Sieber, S., Verhelst, S. H.: A new class of rhomboid protease inhibitors discovered by activity-based fluorescence polarization. *PLoS One* **8**, 72307 (2013)
60. Goel, P., Jumpertz, T., Mikles, D. C., Tichá, A., Nguyen, M. T. N., Verhelst, S., Hubálek, M., Johnson, D. C., Bachovchin, D. A., Ogorek, I., Pietrzik, C. U., Stříšovský, K., Schmidt, B., Weggen, S.: Discovery and Biological Evaluation of Potent and Selective N-Methylene Saccharin-Derived Inhibitors for Rhomboid Intramembrane Proteases. *Biochemistry* **56**, 6713-6725 (2017)
61. Yang, J., Barniol-Xicota, M., Nguyen, M. T. N., Tichá, A., Stříšovský, K., Verhelst, S. H. L.: Benzoxazin-4-ones as novel, easily accessible inhibitors for rhomboid proteases. *Bioorg Med Chem Lett* **28**, 1423-1427 (2018)
62. Goel, P., Jumpertz, T., Tichá, A., Ogorek, I., Mikles, D. C., Hubálek, M., Pietrzik, C. U., Stříšovský, K., Schmidt, B., Weggen, S.: Discovery and validation of 2-styryl substituted benzoxazin-4-ones as a novel scaffold for rhomboid protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **28**, 1417-1422 (2018)
63. Njoroge, F. G., Chen, K. X., Shih, N. Y., Piwinski, J. J.: Challenges in modern drug discovery: a case study of boceprevir, an HCV protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. *Acc Chem Res* **41**, 50-59 (2008)
64. Tichá, A., Stanchev, S., Vinothkumar, K. R., Mikles, D. C., Pachel, P., Began, J., Škerle, J., Švehlová, K., Nguyen, M. T. N., Verhelst, S. H. L., Johnson, D. C., Bachovchin, D. A., Lepšík, M., Majer, P., Stříšovský, K.: General and Modular Strategy for Designing Potent, Selective, and Pharmacologically Compliant Inhibitors of Rhomboid Proteases. *Cell Chem Biol* **24**, 1523-1536 (2017)
65. Rath, A., Deber, C. M.: Design of transmembrane peptides: coping with sticky situations. *Methods Mol Biol* **1063**, 197-210 (2013)
66. Fersht, A.: *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman, New York (1999)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

<b>Jméno a příjmení s adresou</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>